

Neuroanatomie der Sardellenretina – Ein Beitrag zum Verständnis des Polarisationssehens bei Wirbeltieren



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Petra Christiane Koch

München, 18. Oktober 2011



Erstgutachter: PD Dr. Martin Heß

Zweitgutachter: Prof. Dr. Roland Melzer

Eingereicht am: 18.10.2011

Mündliche Prüfung am: 14.12.2011

INHALT

1	ZUSAMMENFASSUNG	4
	SUMMARY	6
2	EINLEITUNG.....	8
2.1	Allgemeines zur Retina und Retinaforschung	9
2.2	Polarisationssehen bei Sardellen und anderen Teleostei	10
2.3	Zielsetzung dieser Arbeit	17
3	PUBLIKATIONEN UND MANUSKRIPTE.....	20
3.1	Histologie der inneren Retina bei <i>Engraulis encrasicolus</i>	20
	Petra C. Koch, Martin Heß (Manuskript in Vorbereitung)	20
3.2	3D-topography of cell nuclei in a vertebrate retina – A confocal and two-photon microscopic study	42
	Koch PC, Seebacher C & Heß M (2010). 3D-topography of cell nuclei in a vertebrate retina – A confocal and two-photon microscopic study.....	42
	<i>Journal of Neuroscience Methods</i> 188: 127–140.	42
3.3	Topographic mapping of retinal neurons in the European anchovy by nuclear staining and immunohistochemistry	58
	Koch PC & Heß M (2011). Topographic mapping of retinal neurons in the European anchovy by nuclear staining and immunohistochemistry. <i>Journal of Neuroscience Research</i> 89: 1316–1330.	58
3.4	3D-Ultrastruktur des retinalen Nervennetzes bei <i>Engraulis encrasicolus</i>	74
	Petra C. Koch, Gerhard Wanner, Martin Heß (Manuskript in Vorbereitung)	74
4	DISKUSSION	121
5	DANK.....	125
6	LITERATUR.....	126
7	BEITRÄGE DER AUTOREN.....	131
8	PUBLIKATIONSLISTE	132
9	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	134

1 ZUSAMMENFASSUNG

Einige Vertreter der Sardellen (Engraulidinae) besitzen eine für Vertebraten einzigartige Struktur und Anordnung der Photorezeptoren: die lichtparallele und zueinander orthogonale Stellung photopigmenttragender Lamellen zweier Zapfentypen erlaubt diesen Fischen die Wahrnehmung linear polarisierten Lichtes (Zwei-Kanal-Analysator). Bisher wurde lediglich die äußere Retina der Sardellen, mit Photorezeptoren, Pigmentepithel und Tapetum, genauer beschrieben (Fineran & Nicol, 1976, 1977, 1978; Zueva, 1980; Heß, 2000, 2009; Heß et al., 2002, 2006).

Mit der vorliegenden Arbeit wird ein multi-methodischer Ansatz zur Untersuchung der **inneren Retina** unternommen, um ein möglichst umfassendes Bild von Morphologie, Feinstruktur, Konnektivität und Dichteverteilung der neuronalen Elemente in der spezialisierten Retina der Europäischen Sardelle *Engraulis encrasicolus* L. zu erhalten.

Die Histologie der inneren Retina wurde mit Semidünnschnitten und fluoreszenzgefärbten Schnitten lichtmikroskopisch untersucht, wobei das Augenmerk auf der Analyse der inneren plexiformen Schicht lag, für die eine Einteilung in zehn mögliche Unterschichten vorgeschlagen wird. Ein erstes Bild von Zelldichteverteilungen, sowie möglichen Konvergenzen und Divergenzen liefert die **Topografie** einzelner Zelltypen, die anhand ihrer fluoreszenzgefärbten Zellkerne klassifiziert und quantitativ ausgewertet wurden. Die Zelldichtekarten der inneren Retina lassen einen deutlichen Bezug der meisten neuronalen Elemente zur Zapfendichteverteilung erkennen (mit Maxima im ventro-temporalen Quadranten und der dorso-nasalen Peripherie), Korrelationskarten konnten mit einfachen arithmetischen Operationen dargestellt werden. Mit Hilfe **immunhistochemischer Färbungen** konnte die Zellklassifizierung und somit die Topografie von Zellen verfeinert und die Neuroanatomie verschiedener Zellpopulationen aufgedeckt werden. Hierbei ergaben sich erste Hinweise auf Konnektivitäten der Sekundärneuronen mit den Photorezeptoren. Durch die **elektronenmikroskopische Untersuchung und dreidimensionale Rekonstruktion** des neuronalen Netzwerkes der Sardellenretina mit der neuen Methode FIB-FESEM (focused ion beam field emission scanning electron microscopy) entstand ein frei manipulierbares, hoch aufgelöstes 3D-Modell aller neuronalen Elemente, anhand dessen erstmals detaillierte Morphologien und Konnektivitäten aller Retinaneuronen und Müllerzellen im untersuchten Volumen (VOI: volume of interest) der Sardellenretina gezeigt werden können. Die räumlichen und synaptischen Beziehungen von drei Horizontalzelltypen, neun Bipolarzelltypen und zahlreichen Amakrinen und Ganglienzellen wurden detailliert beschrieben: die Dendriten der Horizontalzellen 1 (H1), die eine synaptische Präferenz für lange Zapfen zeigen, aber auch Kontakte zu kurzen Zapfen ausbilden, umschließen die synaptischen Bänder (ribbons) der Pho-

torezeptoren lateral (wie alle H-Zelltypen), wobei bis zu drei verschiedene Zellen mit einem synaptischen Band (ribbon) Kontakt aufnehmen können. Die H2 bilden ausschließlich mit kurzen Zapfen, die H3 mit Stäbchen synaptische Kontakte aus. Es liegt der Verdacht nahe, dass die Polyconezapfen der Sardelle aus Rot- und Grünzapfen entstanden sind und die Blauzapfen in diesen Bereichen verschwunden sind.

Die neun Bipolarzelltypen können zunächst – je nach Terminationstiefe in der IPL – in ON- oder OFF-Zellen eingeteilt werden, wobei die Gestalt ihrer Axonterminalen sehr variabel ist. Ihre Konnektivitätsmuster in der äußeren plexiformen Schicht unterscheiden sich und zeigen jeweils eine Präferenz für ein bis zwei Photorezeptortypen. Für Amakrinen und Ganglienzellen kann an dieser Stelle noch keine detaillierte Analyse erfolgen, da ihre dendritischen Felder aufgrund ihrer Ausmaße nur unvollständig im (methodisch bedingt) begrenzten VOI enthalten sind.

Die Ergebnisse der verschiedenen methodischen Ansätze werden jeweils unter Berücksichtigung der Primärliteratur diskutiert. Abschließend folgt eine methodenübergreifende und –vergleichende Diskussion.

Das bisherige Strukturbild der Sardellenretina verfeinert und erweitert sich im Zusammenspiel aller durchgeführten methodischen Ansätze und liefert umfassende neue Erkenntnisse zu Neuroanatomie, Feinstruktur und Konnektivität der Retina eines polarisationskontrastsensitiven Vertebraten.

SUMMARY

Several species of anchovies (Engraulidinae) feature unique structure and arrangement of photoreceptors amongst vertebrates: the position of photopigment containing lamellae, i.e. light-parallel and perpendicular to each other in two cone types, allows for the perception of linearly polarized light (two-channel-analyzer). So far, only the outer retina of anchovies, including photoreceptors, pigment epithelium and tapetum, is described in detail (Fineran & Nicol, 1976, 1977, 1978; Zueva, 1980; Heß, 2000, 2009; Heß et al., 2002, 2006).

In the present study, a multi-methodical approach to study the **inner retina** was accomplished to finally obtain a comprehensive overview of morphology, ultrastructure, connectivity and density distribution of neuronal elements in the specialized retina of the European anchovy *Engraulis encrasicolus* L.

The **histology** of the inner retina was analyzed light-microscopically on the basis of semi-thin and fluorescently labeled sections. Thereby, particular attention was paid to the analysis of the inner plexiform layer by proposing a possible sublayering. A first picture of cell density distributions, cell convergences and divergences is provided by the **topography** of different cell types, classified by fluorescently labeled nuclei and evaluated quantitatively. The cell density maps of the inner retina show a clear correlation between most neuronal elements and the cone density distribution (with maxima in the ventro-temporal quadrant and the dorso-nasal periphery), other cell correlations could be displayed with simple arithmetic operations. **Immunohistochemistry** succeeded in refining the cell classification and therefore the cell topography and could reveal the neuroanatomy of different cell populations. First findings about connectivity of secondary order neurons with photoreceptors were offered by this method. By **electron microscopical analysis and 3-dimensional reconstruction** of the neuronal network of the anchovy retina with the new method of FIB-FESEM (focused ion beam field emission scanning electron microscopy) a freely manipulable, high-resolution 3D-model of all neuronal elements in the volume of interest (VOI) could be generated, displaying detailed morphologies and connectivities of all retinal neurons and Müller cells of the anchovy retina for the first time. The spatial and synaptic relations of three horizontal cell types, nine bipolar cell types and numerous amacrine and ganglion cells were described in detail: the dendrites of horizontal cells 1 (H1), showing a synaptic preference for long cones but contacting short cones as well, embrace the synaptic ribbons of photoreceptors laterally (like all horizontal cell types), whereas up to three different h-cells contact the same synaptic ribbon. H2 exclusively contact short cones, H3 are synaptically linked to rods. We suggest, that the anchovy polycone is composed by the original red- and green-sensitive cones of teleosts, whereas the blue-sensitive cone is lost.

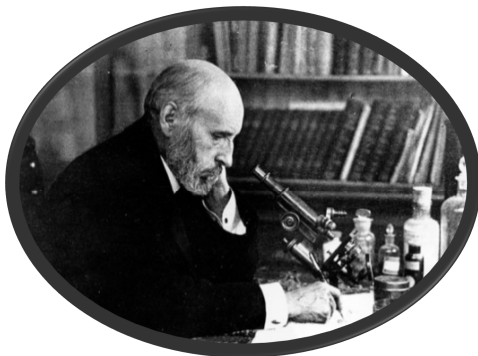
The nine bipolar cell types can be classified in ON- and OFF-cells depending on their termination depth in the IPL, whereas the shape of axon terminals is highly variable. Their different connectivity patterns show preferences for one to two photoreceptor types each. A detailed analysis for amacrine and ganglion cells is not yet possible, as their dendritic fields are too wide to be analyzed in that limited VOI using the method of FIB-FESEM.

The results of the different methodic approaches are discussed with respect to the primary literature. Finally, an attempt for a comprehensive and comparative methodical discussion is made.

Previous structural data of the anchovy retina are refined and extended by the interaction of the methodical approaches presented here and provide extensive new findings about neuroanatomy, ultrastructure and connectivity patterns in the retina of a vertebrate that is sensitive to polarization contrast.

2 EINLEITUNG

*As long as our brain is a mystery, the universe, the reflection of
the structure of the brain, will also be a mystery.*



Santiago Ramón y Cajal (1852–1934)

[zitiert von William Feindel in seinem Vorwort zu:
W. Penfield (1975). *The Mystery of the Mind:
A Critical Study of Consciousness and the
Human Brain. Princeton University Press, New
Jersey. 152 S.*]

Bild:

<http://alford.bios.uic.edu/teaching/Fundamentals%20of%20Neuroscience.html>

2.1 Allgemeines zur Retina und Retinaforschung

Der Spanier Santiago Ramón y Cajal (1852–1934) gilt als der Begründer der Neuroanatomie des Zentralnervensystems von Vertebraten im Allgemeinen und der Retinaforschung im Speziellen. Mit der kurz zuvor vom Italiener Camillo Golgi (1843–1926) entwickelten histologischen Färbetechnik gelang es ihm bereits im ausgehenden 19. Jahrhundert, die Neuronen der Vertebratenretina darzustellen und deren Neuroanatomie zu studieren. Mit diesen Forschungen erhielten die beiden genannten Wissenschaftler im Jahr 1906 den Nobelpreis für Medizin.

Die Strukturforschung der Retina ist ein breites Feld und ist einerseits humanmedizinisch motiviert, andererseits werden Studien mit Blick auf die spezielle Natur anderer Arten vorangetrieben. Beide Bereiche können vergleichend verknüpft werden und somit kann die Humanmedizin thematisch wie methodisch von Erkenntnissen anderer Vertebratenretinae profitieren. Bereits die rein morphologische Perspektive der Retinaforschung kann solide Aussagen zu Funktion, Adaptation und Evolution artspezifischer Merkmalsausprägungen machen, weil Struktur und Funktion untrennbar miteinander verbunden sind (Wainwright, 1988) und sich die Plastizität des Retinagrünplans in Anpassung an unterschiedlichste photische Habitate gerade bei den Knochenfischen eindrucksvoll darstellt (Walls, 1942; Lythgoe, 1979).

Das Licht dient als Träger diverser Information (codiert u.a. in Wellenlänge, Lichtmenge, Polarisationsgrad) und wird über verschiedenste rezeptive Strukturen wahrgenommen. Ein besonderes Organ zur Lichtperzeption sind die Lateralaugen der Vertebrata, die im Wesentlichen alle dem gleichen Grundbauplan folgen und zu „unseren“ menschlichen Augen homolog sind. Die Entwicklung von zwei Photorezeptortypen (*Retina duplex* aus Zapfen und Stäbchen), um die stark schwankenden Lichtmengen bei Tag, Dämmerlicht und Nacht optimal auszunutzen, ist weit verbreitet (z.B. Bloomfeld & Dacheux, 2001). Die phylogenetisch zuerst entstandenen Zapfen, deren Photopigment-Isomerisierung bei physiologischer Lichtmenge nicht gesättigt ist, weisen eine relativ geringe Lichtsensitivität auf und funktionieren somit optimal bei hellem Tageslicht (photopisches System). Das Stäbchensystem (skotopisches System), das dem Zapfensystem „huckepack“ aufsitzt (Lamb, 2009), kann durch seine enorme Lichtsensitivität auch geringste Lichtmengen für den Organismus nutzbar machen.

Die Retina der Teleostei, die sozusagen den „Prototyp“ der Vertebratenretina darstellt, zeigt zahlreiche Variationen dieses Grundthemas, wobei die jeweils ausgeprägte Struktur die Anpassung an spezielle Habitate und visuell gesteuerte Verhaltensweisen widerspiegelt (siehe z.B. Lythgoe, 1972, 1975, 1979). Innerhalb der Teleostei zeigt sich eine große Variation bzgl. Photorezeptortypen und ihrer Gruppierung in funktionelle Einheiten (Einzel-,

Doppel-, Dreifachzapfen), -mustern (Dreiecks-, Quadrat-, Reihemuster), Pigmentepithel-Architektur (z.B. Wunder, 1930), sowie Schichtdicken und Zelldichtevertreibungen (z.B. Zonen erhöhter Sehschärfe oder Lichtsensitivität). Die Erfindung des Farbsehens durch unterschiedliche Zapfentypen mit spektral distinkten Opsinen innerhalb der Teleostei, gilt als großer Schritt zur Auswertung von Umgebungsinformationen bei schwierigen Kontrastverhältnissen (Objekterkennung und Emanzipierung von der Gesamthelligkeit; Ali, 1975). Die genannten Unterschiede können auch im Verlauf der Ontogenese (Lachse: Lyall, 1957; Bowmaker & Kunz, 1987; Browman & Hawryshyn, 1992; Novales Flamarique & Hawryshyn, 1996; Novales Flamarique, 2000) und/oder innerhalb der Retina eines Individuums auftreten und jene somit regionieren (Munk, 1966; Ali & Klyne, 1985; Heß, 2009; Koch et al., 2010).

Die Retina ist als leistungsstarker Bildverarbeitungsrechner zu verstehen. Sie nimmt über die äußere Retina das räumlich-zeitliche-Strahlungsmuster der Umwelt auf und wandelt es auf der Ebene der Photorezeptorterminalen in ein primäres, cyto-elektrisches Erregungsmuster um. Durch Weitergabe und Verrechnung über drei Typen von Sekundärneuronen in radialer und horizontaler Richtung, findet eine Filterung und Signalverarbeitung statt (z.B. laterale Inhibition, Gegenfarbenkontraste, Richtungsselektion). Über unterschiedliche Ganglienzellpopulationen werden mehrere Komponenten (z.B. Luminanz, Farbkontraste, Bewegungen) des ursprünglichen Erregungsmusters ans Gehirn weitergeleitet. Dies erfolgt in artspezifischer Weise. Die genaue Kenntnis der zugrundeliegenden Strukturen ist für ein Verständnis der Arbeitsweise wichtig.

2.2 Polarisationssehen bei Sardellen und anderen Teleostei

Sonnenlicht ist, bevor es in die Erdatmosphäre eintritt, *per se* unpolarisiert. Durch Streuung an atmosphärischen Komponenten wie Gasen, Aerosolen, Wassertröpfchen oder Eiskristallen wird das Sonnenlicht teilweise linear polarisiert (\rightarrow gleiche e-Vektoren), was zu einem charakteristischen Polarisationsmuster am Himmel führt (z.B. Horváth & Varjú, 2004). Da die maximale lineare Polarisation bei senkrechter Streuung entsteht, ist am Himmel ein Band besonders stark linear polarisierten Lichts 90° zum Sonnenstand zu beobachten (z.B. Hawryshyn, 1992). Demnach ändert sich das Polarisationsmuster des Himmels mit dem täglichen Sonnenstand, woran sich z.B. Honigbienen orientieren (z.B. Frisch, 1949). Es überträgt sich durch das Snellius'sche Fenster bedingt bis in etliche Meter Tiefe auch ins Wasser (Horváth & Varjú, 1995). Jenseits des Snellius'schen Fensters bildet sich durch polarisierende Lichtstreuung an Wassermolekülen ein eigenes Polarisationsmuster, das ein aquatisches Tier wie eine Kugel umgibt und deren Horizontalebene ein Band maximaler, linearer Polarisation bildet (Waterman, 1954; Jerlov, 1968; Hawryshyn, 1992; Novales

Flamarique & Hawryshyn, 1997). In der Literatur finden sich keine eindeutigen Hinweise, dass sich Teleostei – ähnlich den Honigbienen – an diesem Polarisationsmuster großräumig orientieren (s.a. Heß, 2000), wohl aber Spekulation darüber (Salmoniden: Hawryshyn et al., 1990; Parkyn & Hawryshyn, 2000).

Polarisiertes Licht wird von **Sardellen** vermutlich ebenfalls nicht zur Navigation oder Orientierung als Informationsträger genutzt, was im Folgenden erläutert wird. Um Kontraste wahrzunehmen (Farb- oder Polarisationskontraste), sind mindestens zwei verschiedene Systeme notwendig, die auf unterschiedliche Qualitäten eines „Bildpunktes“ reagieren und beide Antworten in geeigneter Weise verarbeiten, um eine Kontrastinformation zu erzeugen (Hawryshyn et al., 1990). Beim Farbkontrastsehen sind diese Qualitäten unterschiedliche Wellenlängen des einfallenden Lichts (detektiert durch spektral unterschiedlich empfindliche Zapfentypen, s.o.), beim Polarisationskontrastsehen senkrecht zueinander stehende e-Vektoren. Diese werden von Invertebraten mit orthogonalen Mikrovillissäumen der Retinulazellen (Rhabdomere) eines Ommatidiums diskriminiert. Im Vetrebratenbauplan (photosensitive Membranlamellen der Außenglieder beider Photorezeptortypen senkrecht zur Lichteinfallsrichtung) kann dieser Zwei-Kanal-Analysator für polarisiertes Licht durch senkrecht zueinander, aber gleichzeitig parallel zum einfallenden Licht stehende Lamellen der Zapfenaußenglieder, gebildet werden. Eine derartige spezielle Bauplananpassung an das photische Habitat wurde bei *Anchoa*-Arten erstmals von Fineran & Nicol (1976) nachgewiesen (siehe Kapitel 2.2). Es folgte der Nachweis gleicher Strukturen für weitere Gattungen innerhalb der Engraulidinae (s.a. Tab. 2.2.1): *Engraulis* (Zueva, 1980; Zueva & Govardovskii, 1991; Heß, 2000; Novales Flamarique & Hawryshyn, 1998; Novales Flamarique, 2011), *Lycengraulis*, *Stolephorus*, *Anchoviella* und *Encrasicholina* (alle Heß, 2000). Bei diesen Sardellenarten herrschen in der Retina zwei Zapfentypen vor: lange Zapfen und kurze Zapfen mit durch Pigmentepithelkeile zweigespaltenen Außengliedern (Abb. 2.2.1 A). Die beiden Zapfentypen sind abwechselnd in langen Zapfenreihen, den „polycones“, angeordnet, zwischen denen die Stäbchen liegen. Ein Außenglied eines langen Zapfens und die Hälften der flankierenden Außenglieder zweier kurzer Zapfen, bilden (theoretisch) jeweils eine funktionelle Einheit (Fineran & Nicol, 1976, 1978). Eine weitere augenfällige Besonderheit ist die Orientierung der Membranlamellen der Außenglieder entlang der Zellachse und somit parallel zum einfallenden Licht (und zudem orthogonal bzgl. benachbarter Zapfen). Die Absorption der Photopigmente ist optimal, wenn der e-Vektor des Lichts parallel zum 11-*cis*-Retinal ist, das wiederum in der Membranebene frei rotiert (Abb. 2.2.1 C). Der resultierende Vektor des Retinals ist somit parallel zur Membran, was dazu führt, dass beim langen Zapfen die Absorption bei einem e-Vektor senkrecht zum Polycone am höchsten ist, beim kurzen Zapfen im 90°-Winkel dazu in Verlaufsrichtung des Polycones.

Zusätzlich tragen die Guaninplättchen der Pigmentepithelkeile als Keilspiegel zur verstärkten Lichtausbeute der langen Zapfen bei, da an diesen Plättchen bevorzugt Licht mit oberflächenparallelem e-Vektor reflektiert wird (plättchen-parallel = polycone-senkrecht). Dadurch wird das Licht, dem bereits die vom kurzen Zapfen absorbierte polycone-parallele Komponente fehlt, mehrmals „geeignet“ für lange Zapfen zwischen den Keilen reflektiert und passiert so mehrfach die Lamellen der langen Zapfen. Dies ist sinnvoll, da die Lamellen der langen Zapfen nicht perfekt radial ausgerichtet sind, sondern einen Kippungsgradienten zeigen und somit nur bedingt selektiv für Polycone-senkrechte e-Vektoren sensitiv sind (Heß, 2000).

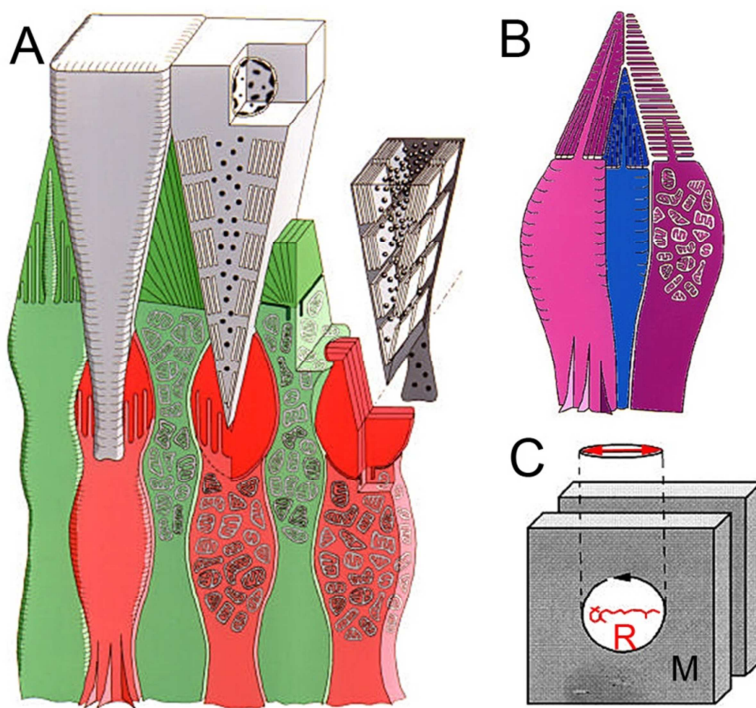


Abb. 2.2.1 Schematischer Aufbau von Polycone und Dreifachzapfen bei *E. encrasicolus*.
(aus Heß, 2000).

A Der Polycone besteht aus abwechselnd angeordneten langen (grün) und kurzen Zapfen (rot), deren Außenglieder durch Pigmentepithelkeile gespalten sind. Beachte die Lamellenstellung der Außenglieder parallel zum einfallenden Licht. **B** Dreifachzapfen finden sich in Bereichen der dorsalen und ventralen Retina und bestehen aus zwei lateralen größeren Zapfen (magenta), die einen zentralen, kleineren Zapfen (blau) umschließen. Die Stellung ihrer Membranlamellen ist senkrecht zum einfallenden Licht (= Grundplan der Vertebrata). **C** Die Rotation des Retinals (**R**, rot) erfolgt in der Ebene der Membran (**M**), so dass der resultierende Dipol-Vektor ebenfalls parallel zur Membran liegt (**Doppelpfeil**).

Der Polycone stellt – wie bereits erwähnt – die vorherrschende Retinaarchitektur der Sardelle dar. Eine Abweichung besteht in Bereichen der dorsalen und ventralen Retina, in denen lange Reihen aus Dreifachzapfen ausgebildet sind (Zueva & Govardovskii, 1991; Heß, 2000, 2009). Sie bestehen aus zwei lateralen, morphologisch gleichartigen Zapfen und einem zentralen Zapfen in linearer, der Zapfenreihe folgender, Anordnung (Abb. 2.2.1 B). Die lateralen Elemente sind deutlich länger und voluminöser. Es fällt auf, dass die Membranfalten senkrecht zum einfallenden Licht, also für Vertebraten „normal“ orientiert sind, ein Polarisationskontrastsehen kann für diese Bereiche der Retina also ausgeschlossen werden. Viel mehr gibt es morphologische (Heß, 2009) und physiologische (*E. mordax*: Loukashkin & Grant, 1965) Hinweise auf ein Farbsehen bei Sardellen, was nicht durch die Polycones (identische Farbpigmente der Zapfentypen; Zueva & Govardovskii, 1991; Novales Flamarique & Hawryshyn, 1998; Novales Flamarique & Harosi, 2002), aber durch die Dreifachzapfenregionen bewerkstelligt werden könnte (Zueva & Govardovskii, 1991; Heß, 2009).

Zahlreiche physiologische Studien haben eine Sensitivität und Diskriminierbarkeit für polarisiertes Licht bei Vertretern mehrerer Familien der Teleostei nachgewiesen (Review in: Kamermans & Hawryshyn, 2011), nämlich in Pomacentriden (Hawryshyn et al., 2003; Mussi et al., 2005), Salmoniden (Parkyn & Hawryshyn, 1993, 2000), Centrarchiden (Cameron & Pugh, 1991), Cichliden (Davitz & McKaye, 1978) und Cypriniden (Hawryshyn & McFarland, 1987). Bei diesen Fischen ist der Zusammenhang zwischen Photorezeptormorphologie und postuliertem Polarisationskontrastsehen biophysikalisch jedoch nicht so plausibel erklärbar wie bei den Sardellen.

Cameron & Pugh (1991) postulierten am Beispiel des Grasbarsches *Lepomis cyanellus*, dass der elliptische Querschnitt der Innensegmente der Doppelzapfen eine geometrische Doppelbrechung ermöglicht und Licht einer Polarisationsrichtung effizienter einfängt und an die Außensegmente weiterleitet. Ein weiterer Mechanismus wurde für Salmoniden (*Oncorhynchus mykiss*) vorgeschlagen: die Doppelzapfen (mittel-/langwellig sensitive Zapfen) besitzen eine Trennmembran, die polarisiertes Licht transversal zur Photorezeptorachse auf die benachbarten UV-sensitiven Zapfen reflektieren und somit als dichroischer Spiegel fungieren könnte (Novales Flamarique et al., 1998). Bei Goldfischen wurde axialer Dichroismus in den MWS-Zapfen (mittelwellig sensitiv) nachgewiesen, der zusammen mit anderen Spezialisierungen im Zapfenaußenglied (z.B. Viskosität, die die Chromophoren in einer Achse ausrichtet) zu Polarisationskontrastsensitivität führen könnte (Roberts & Needham, 2007). Es liegt also der Schluss nahe, dass „normale“ Doppelzapfen ebenfalls zur Wahrnehmung von Polarisationskontrasten fähig sind (Waterman & Forward, 1970; Hawryshyn & Bolder, 1990; Hawryshyn et al., 1990), was zur Kontrastverstärkung, visuellen Kommunikation oder räumlichen Orientierung dient (Kamermans & Hawryshyn, 2011).

Tabelle 2.2.1 Historischer Abriss über die Erforschung der Sardellenretina.
(ergänzt nach Heß, 2000).

Jahr	Autor	Titel	Art; Methode(n)
1938	McEwan	A comparison of the retina of mormyrids with that of various other teleosts.	<i>Engraulis encrasicolus</i> ; Lichtmikroskopie (LM), Chemie
1958	Munz	The photosensitive pigments of fishes from relatively turbid coastal waters.	<i>Anchoa compressa</i> ; Spektroskopie
1960	Borisov & Protasov	Some aspects of light perception in fish and selective light sources.	<i>E. encrasicolus</i> ; Verhalten
1960	Protasov et al.	Morphological and functional features of the transition from day vision to twilight vision in some Black Sea fish.	<i>E. encrasicolus</i> ; Verhalten, LM
1963	O'Connell	The structure of the eye of <i>Sardinops caerulea</i> , <i>Engraulis mordax</i> , and four other pelagic marine teleosts.	<i>E. mordax</i> , <i>A. compressa</i> ; LM, Chemie
1965	Loukashkin & Grant	Behaviour and natural reactions of the northern anchovy, <i>Engraulis mordax</i> Girard, under the influence of light of different wavelengths and intensities and total darkness.	<i>E. mordax</i> ; Verhalten
1972	Ali & Heumann	Distribution of vitamins A1 and A2 in the retinas of some marine fishes from the Gulf of California II.	<i>A. compressa</i> ; Spektren
1973	Nicol et al.	Tapeta lucida in bony fishes (Actinopterygii): a survey.	<i>A. hepsetus</i> , <i>A. mitchilli</i> ; TEM, Chemie
1973	Zyznar & Nicol	Reflecting materials in the eyes of three teleosts.	<i>A. mitchilli</i> ; Spektren, Chemie
1976	Fineran & Nicol	Novel cones in the retina of the anchovy (<i>Anchoa</i>).	<i>A. hepsetus</i> , <i>A. mitchilli</i> ; TEM
1977	Fineran & Nicol	Studies on the eyes of anchovies <i>Anchoa mitchilli</i> and <i>A. hepsetus</i> (Engraulidae) with particular reference to the pigment epithelium.	<i>A. hepsetus</i> , <i>A. mitchilli</i> ; TEM, Spektren
1978	Fineran & Nicol	Studies on the eyes of anchovies <i>Anchoa mitchilli</i> and <i>A. hepsetus</i> (Engraulidae) with particular reference to the cones.	<i>A. hepsetus</i> , <i>A. mitchilli</i> ; TEM
1980	Zueva	Retinal cones of the black sea anchovy <i>Engraulis encrasicolus</i> – an analyzer of polarized light in vertebrates.	<i>E. encrasicolus</i> ; TEM
1991	Zueva & Govardovskii	Photoreceptors and visual pigments in the retina of the Black Sea anchovy, <i>Engraulis encrasicolus</i> .	<i>E. encrasicolus</i> ; LM, EM, Spektroskopie
1998	Heß et al.	Density map and patterns of cone photoreceptors in the retina of the European anchovy <i>Engraulis encrasicolus</i> L. (Engraulidae, Clupeiformes).	<i>E. encrasicolus</i> ; LM, Kartierung
1998	Novalés Flamarique & Hawryshyn	Photoreceptor types and their relation to the spectral and polarization-sensitivities of clupeid fishes.	<i>E. mordax</i> ; TEM, Elektrophysiologie

Jahr	Autor	Titel	Art; Methode(n)
2000	Heß	Vergleichende feinstrukturelle Untersuchungen an der Netzhaut der Europäischen Sardelle <i>Engraulis encrasicolus</i> L. (Engraulidae) und den Retinae anderer Clupeiformes.	<i>Anchoviella</i> sp., <i>Cetengraulis mysticetus</i> , <i>Coilia nasus</i> , <i>Encrasicholina heteroloba</i> , <i>E. encrasicolus</i> , <i>E. mordax</i> , <i>Lycengraulis batesii</i> , <i>Lycothrissa crocodilus</i> , <i>Setipinna taty</i> , <i>Stolephorus indicus</i> , <i>Thryssa setirostris</i> ; LM, TEM, REM
2001	Awaiwanont et al.	Grouped, stacked rods and tapeta lucida in the retina of Japanese anchovy <i>Engraulis japonicus</i> .	<i>E. japonicus</i> ; TEM, REM, Chemie
2001	Haacke et al.	Fine structure and development of the retina of the grenadier anchovy <i>Coilia nasus</i> (Engraulidae, Clupeiformes).	<i>C. nasus</i> ; LM, TEM
2002	Novales Flamarique & Harosi	Visual pigments and dichroism of anchovy cones: A model system for polarization detection.	<i>A. mitchili</i> ; Mikrospektrophotometrie
2002	Heß et al.	The pattern of cone pedicles and horizontal cells in the retina of the European anchovy, <i>Engraulis encrasicolus</i> L. (Engraulidae, Clupeiformes).	<i>E. encrasicolus</i> ; TEM, DiI-Applikation
2006	Heß et al.	The structure of anchovy outer retinae (Engraulidae, Clupeiformes) – a comparative light- and electron-microscopic study using museum-stored material.	16 Arten der Clupeoidei; LM, TEM
2007	Heß	Semi-automated mapping of cell nuclei in 3D-stacks from optical-sectioning microscopy.	<i>E. encrasicolus</i> ; CLSM, Kartierung
2009	Heß	Triple cones in the retinae of three anchovy species: <i>Engraulis encrasicolus</i> , <i>Centengraulis mysticetus</i> and <i>Anchovia macrolepidota</i> (Engraulidae, Teleostei).	<i>Anchovia macrolepidota</i> , <i>C. mysticetus</i> , <i>E. encrasicolus</i> ; LM, TEM, REM
2010	Koch et al.	3D-topography of cell nuclei in a vertebrate retina – a confocal and two-photon microscopic study.	<i>E. encrasicolus</i> ; CSLM, Kartierung
2011	Koch & Heß	Topographic mapping of retinal neurons in the European anchovy by nuclear staining and immunohistochemistry.	<i>E. encrasicolus</i> ; IHC, CLSM, Kartierung
2011	Novales Flamarique	Unique photoreceptor arrangements in a fish with polarized light discrimination.	<i>E. mordax</i> ; IHC, TEM
2011	Kondrashev et al.	Retinal specialization for polarization and colour vision in two species of anchovies (Engraulidae, Clupeiformes).	<i>E. encrasicolus</i> , <i>E. japonicus</i> ; TEM, Mikrospektrophotometrie

Die Polycones von *E. encrasicolus* sind (global) konzentrisch um das innere Ende der optischen Furche angeordnet (somit mehr oder weniger parallel zur *Ora serrata*), betrachtet man aber nur einen lokalen Ausschnitt, ist die Krümmung nicht zu erkennen und die Reihen scheinen gerade. Dies könnte eine Erklärung für die späte Entdeckung der Polycones sein (vgl. z.B. O'Connell, 1963; Nicol et al., 1973). Die aus der Struktur und Anordnung der Zapfen resultierende bzw. postulierte spezifische Wahrnehmungsfähigkeit von linear polarisiertem Licht (Fineran & Nicol, 1976–1978; Land, 1991; Novales-Flamarique & Hawryshyn, 1998) wird von den Sardellen vermutlich zur Kontrastbildung für die Objekterkennung der näheren Umgebung genutzt (Fineran & Nicol, 1978; Hawryshyn, 1992; Heß, 2000). Die Europäische Sardelle *Engraulis encrasicolus*, ein pelagischer Schwarmfisch, lebt im Mittelmeer in einigen Metern bis 150 m Tiefe, im Allgemeinen über sandigem Grund (oftmals trübe) und ernährt sich von Zooplankton (Fineran & Nicol, 1976). Dieses Habitat bedeutet beschränkte Sichtweiten und Farbumfang (wellenlängenabhängige Absorptionscharakteristik des Wassers), sowie beschränkte Helligkeitskontraste zwischen benachbarten Objekten. Allerdings bestehen deutliche Unterschiede in der Polarisation: das Hintergrundwasser erscheint horizontal polarisiert (s.o.), das von der Oberfläche von Objekten (z.B. Fischen, Plankton) reflektierte Licht wird depolarisiert (Denton & Nicol, 1965; Denton, 1970; Cameron & Pugh, 1991).

Eine kleinräumige Analyse der e-Vektor-Richtung bzw. des Polarisationsmusters wird bei der Sardelle durch die präzise Anordnung der orthogonalen Filter benachbarter Zapfen (senkrecht zueinander stehende Membranlamellen) ermöglicht und kann – vermutlich – in Helligkeits- oder Farbkontrast „übersetzt“ werden (Heß, 2000). Ein ähnlicher Mechanismus ist für die Retina von Cephalopoden nachgewiesen (Shashar & Cronin, 1996; Shashar et al., 1996). Somit könnte das Grundproblem des geringen Kontrasts unter Wasser die Evolution des Polarisationskontrastsehens bedingt haben (s.a. Ali, 1975).

2.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Nach der ausführlichen Untersuchung und Beschreibung der äußeren Retina von *E. encrasicolus* durch Dr. Martin Heß (s. Tab. 2.2.1), sollte nun die innere Retina bearbeitet werden, um mit Hinweisen aus der Strukturforschung (Zelltypen, Neuroanatomie, Zelldichteverteilung) die funktionellen Aspekte der Sardellenretina als Ganzes und des Polarisationssehens im Speziellen erklären zu können (z.B. Verschaltungsregeln, -geometrie, Kanal-trennung, Verarbeitung des bimodalen Polarisationssignals etc.). Für eine Fortsetzung der Regelmäßigkeit des Zapfenmusters in der inneren Retina gibt es mehrere Hinweise (siehe Heß, 2000): (1) Schachbrettmuster der Zapfenendfüßchen (= pedicles), (2) räumliche Trennung der synaptischen Kontaktzonen von langen und kurzen Zapfen auch in radialer Richtung (Substratifizierung der äußeren plexiformen Schicht), (3) geometrisch nicht zufällige Gruppierung zweier Synapsenfelder zumindest im langen Zapfen-Pedicle, (4) Reihenumuster von Bläschen in der inneren plexiformen Schicht (IPL). Ein Polarisationskontrastsehen kann nur funktionieren, wenn benachbarte orthogonal orientierte Analysatoren in geeigneter Weise miteinander verschaltet sind (vermutlich basierend auf dem „normalen“ Farbkontrastrechner). Üblicherweise gibt es für jeden Informationskanal (= Zapfentyp) separate Bipolarzellen (ON- und OFF-Bipolaren), die mittels Amakrinen und Ganglienzellen im Sinne eines Gegenfarbenmechanismus miteinander verrechnet werden. Da im polarisationssensitiven Bereich der Sardellenretina nur zwei Zapfentypen in sehr regelmäßigem Muster auftreten, ist es denkbar, langfristig sowohl Verschaltungsregeln (Zelltyp-Spezifität), als auch Verschaltungsgeometrie aufklären zu können und einem mechanistischen Verständnis des Polarisationskontrastsehens näher zu kommen.

Hierzu sollte die innere Retina mit verschiedenen Schnitt- (Semi-, Ultradünnschnitte, Agar-dickschnitte), Färbe- (histologisch, fluoreszent, immunhistochemisch) und mikroskopischen Techniken (Licht-, Laserscanning-, Elektronenmikroskopie) untersucht werden. Die daraus resultierenden vier methodischen und inhaltlichen Ansätze werden in den folgenden Kapiteln als vorläufiges Manuskript (Kapitel 3.1, 3.4) oder Publikation (3.2, 3.3) **kumulativ** dargestellt. Die bisher unveröffentlichten Manuskripte (3.1, 3.4) sind in deutscher Sprache verfasst, die Abbildungen und Tabellen wurden für ein einheitliches Erscheinungsbild den Kapiteln entsprechend durchnummeriert.

Die Abfolge der Kapitel ist chronologisch, so dass der zunehmende Erkenntnisgewinn, sowie die zunehmende Verfeinerung und Komplexität der Methoden verdeutlicht wird:

- Semidünnschnittserien sind relativ einfach, schnell und kostengünstig anzufertigen und liefern einen guten histologischen Überblick; weiterführende Methoden, wie z.B. 3D-Markierung von Zellkernen und ihre Klassifizierung, wurden getestet (Kapitel 3.1).

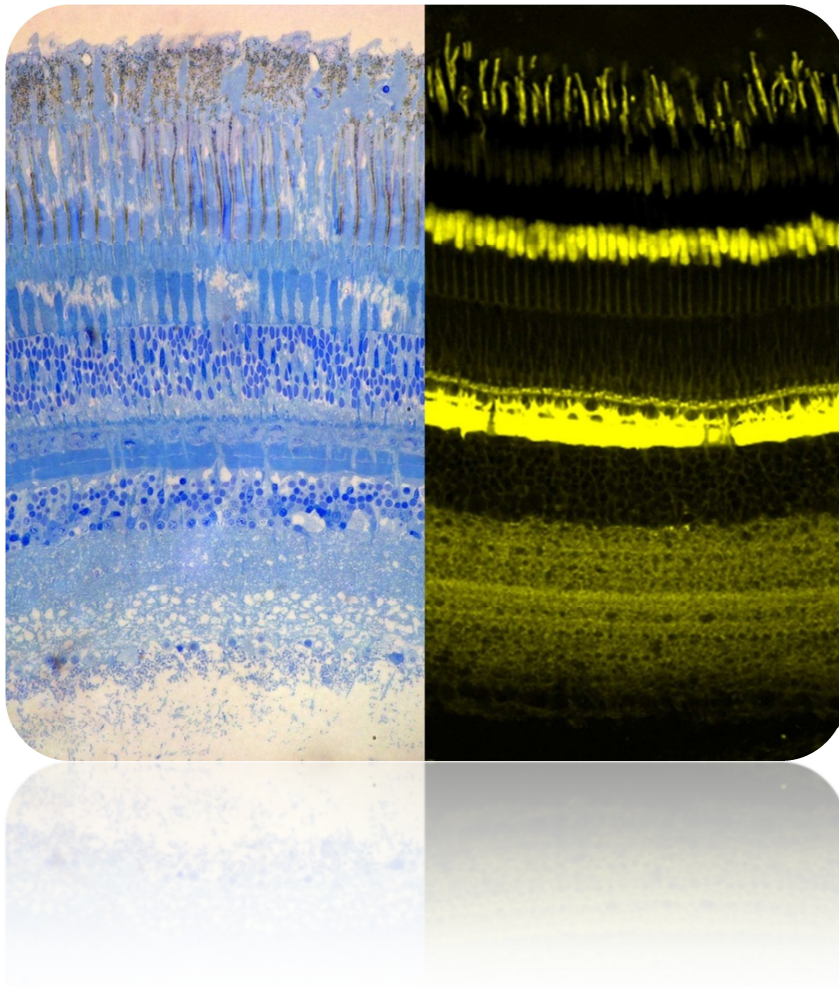
- Ein weiterer Schritt zum Verständnis von Verschaltungsregeln ist die Zelldichteverteilung; eine Zellkerntopografie kann mit spezifischen, fluoreszenten Kernfärbungen und Laserscanningmikroskopie gelingen, die allein auf Zellkernmerkmalen basierende Klassifizierung erweist sich aber als limitiert und z.T. fehlerbehaftet (Kapitel 3.2).
- Es sind neuroanatomische Färbungen notwendig, um die Zellklassifizierung zu verfeinern und sicherer durchzuführen, sowie um Zellmorphologien aufzudecken (Kapitel 3.3).
- Durch das begrenzte Auflösungsvermögen der Lichtmikroskopie können zelltypspezifische Konnektivitäten nur bedingt erkannt werden. Die Vernetzung auf ultrastrukturellem Niveau kann mit konventioneller Transmissionselektronenmikroskopie zweidimensional und sehr bedingt auch dreidimensional untersucht werden. Letztendlich bedarf es einer hochaufgelösten, großräumigen, dreidimensionalen Untersuchung eines Retinavolumens, was technisch erstmals im letzten Viertel dieser Dissertation durch die Markteinführung von FIB-FESEM ermöglicht wurde (Kapitel 3.4).

Der Titel der vorliegenden Arbeit „Neuroanatomie der Sardellenretina“ trifft im engeren Sinne nur auf die Kapitel 3.3 und 3.4 zu – die vorausgehenden histologischen (3.1) und topografischen (3.2) Kapitel müssen als Voraussetzung für und Vorbereitung auf die morphologisch-neuroanatomischen Kapitel verstanden werden.

3 PUBLIKATIONEN UND MANUSKRIPTE

3.1 Histologie der inneren Retina bei *Engraulis encrasicolus*

Petra C. Koch, Martin Heß (Manuskript in Vorbereitung)



Einleitung

Obwohl die auf Polarisationskontrastsehen spezialisierte Retina der Sardelle gut beschrieben ist (Fineran & Nicol, 1978; Zueva, 1980; Heß et al., 2002, 2006; Heß, 2009; Novales Flamarique, 2011; siehe auch Haacke et al., 2001), wurde die morphologische Organisation der inneren Retina bisher nur grob untersucht (O'Connell, 1963; Heß et al., 2002). Als erster, leicht gangbarer Weg, einen Überblick über das komplex verwobene Gewebe der inneren Retina von *Engraulis encrasicolus* zu gewinnen, kann die Kunstharz-Histologie gewählt werden. Nach Richardson et al. (1960) gefärbte Semidünnschnittserien bieten einen guten Kontrast (Erscheinungsbild im Lichtmikroskop ähnlich dem der Transmissionselektronenmikroskopie), optimale lichtmikroskopische Auflösung (in x-, y- und z-Richtung) und sie sollten – wenn auch bedingt – für dreidimensionale Rekonstruktionen tauglich sein. Vibratomschnitte für fluoreszenzhistologische Untersuchungen bieten ein weiteres Kontrastverfahren, sowie eine variable z-Auflösung durch optisches Schneiden.

Hier wird zunächst anhand von radialen und tangentialen Semidünnschnittserien, sowie ausgewählt fluoreszenzgefärbten Schnitten, eine lichtmikroskopische Untersuchung der Architektur v.a. der inneren Retina durchgeführt. Im Fokus liegen (1) die Darstellung der grundsätzlichen Schichtung der Retina (Grundplan), (2) die Untersuchung der Substratifikationen der plexiformen Schichten, soweit lichtmikroskopisch auflösbar, sowie (3) die Klassifizierung und Dichteabschätzung von Zelltypen (Körnerschichten, Bipolarterminalen) und gegebenenfalls Berechnung und Deutung erster Zellzahlverhältnisse. Es werden mehrere Methoden zur Zelldichtekartierung erprobt, um anschließend eine vollständige Topografie mit der praktikabelsten Methode zu erstellen (siehe Kapitel 3.2). Hierfür muss zunächst eine Zellklassifizierung anhand der Zellkerne als Stellvertreter vorgenommen werden.

Eine regelhafte Anordnung der Photorezeptoren (Zapfen) und somit eine Ausbildung distinkter geometrischer Muster findet sich bei den meisten Teleostei (z.B. Eigenmann & Shafer, 1900; Wagner, 1972; Lyall, 1957). Die vorherrschenden Zapfentypen mit unterschiedlicher spektraler Sensitivität sind Doppelzapfen mit dazwischenliegenden Einzelzapfen (z.B. Hibbard, 1971; Engström, 1963; Stell & Lightfoot, 1975).

Bei der Europäischen Sardelle *Engraulis encrasicolus* hingegen sind zwei Typen von Photorezeptoren mit senkrecht zueinander orientierten e-Vektor-Sensitivitäten abwechselnd in langen Reihen, den sog. Polycones, angeordnet (Ausnahme Dreifachzapfenregion, s. Heß, 2009). Das daraus resultierende Schachbrettmuster der Zapfen sollte in tieferen Schichten der inneren Retina, d.h. bei nachgeschalteten Neuronen, persistent sein und den gleichen geometrischen Regeln unterliegen (erste Hinweise siehe Heß, 2000: Abb. 3.39 D, E), ein Prinzip, dass auch für andere Teleostei gezeigt wurde (Horizontalzellen: Haesendonck &

Missotten, 1979; Innere plexiforme Schicht: Podugolnikova & Maksimov, 1975, Podugolnikova, 1985, Haesendonck & Missotten, 1983; Ganglienzellschicht: Cook & Noden, 1998).

Geometrisch regelmäßige, horizontale Muster, die die plexiformen Schichten substratifizieren, werden untersucht und deren Korrelierbarkeit mit den Polycones anhand von 3D-Strukturdatensätzen (Tangential- und Radialschnittserien) ausgewertet.

Material und Methoden

Bezugsquelle der Sardellen

Frische Exemplare der Europäischen Sardelle (Abb. 3.1.1 A) sind praktisch nur direkt am Meer erhältlich. Allerdings sind die „frischen“ Fische, die auf einem Fischmarkt käuflich zu erwerben sind, bereits seit mehreren Stunden tot, was die Gewebeerhaltung, zumindest auf feinstrukturellem Niveau, merklich beeinträchtigt. Aus diesem Grund wurden die Sardellen direkt von spezialisierten Fischern unmittelbar nach dem Anlanden bezogen. Als zuverlässige und erprobte Quelle erwiesen sich die Fischer von Rovinj in Kroatien (siehe Heß, 2000).

Sardellen werden dort z.B. nachts mittels Lichtfallen und Ringwaden gefangen, was besonders zur Zeit um Neumond erfolgreich ist, wenn kein störendes Mondlicht vorhanden ist. Bei der Lichtfallenfischerei wird mit starken Scheinwerfern die Wasseroberfläche beleuchtet, was zunächst positiv phototaktisches Zooplankton anlockt, später folgen planktivore Fische. Der Fischschwarm wird mit einer Ringwade (Netz) immer weiter zusammengetrieben und konzentriert und schließlich mit Schöpfnetzen an Bord gehoben. Für die etwa zweistündige Heimfahrt zum Hafen werden die Fische auf Eis gekühlt. Dennoch sterben die meisten Sardellen bereits an Bord des Fischkutters, da sie äußerst empfindlich gegenüber mechanischen Verletzungen, Sauerstoffmangel und Stress reagieren. Somit konnten die Sardellen direkt von den Fischern 2–3 Stunden *post mortem* bezogen werden. Die Augen wurden so rasch wie möglich entnommen (Abb. 3.1.1 B, C), Cornea, Linse und Glaskörper vorsichtig entfernt und die Augenbecher (Abb. 3.1.1 D) in 4%igem Formaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer (PB; pH 7,2) fixiert. Bis zur weiteren Bearbeitung in München verblieben die Augenbecher gekühlt bei 4°C im Fixativ.

Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Nach der Einbettung eines ventro-temporalen Sektors der Retina in 4%igen Agar wurden an einem Vibratom (Leica VT 1000S) radiale, sowie tangential, 50 µm dicke Schnitte angefertigt. Sie wurden bei Raumtemperatur für 40 min in einer Lösung aus Weizenkeimagglutinin konjugiert mit TexasRed (WGA; Molecular Probes; in 0,1 M PB) inkubiert.

Die so angefärbten Schnitte wurden mit einem Leica SP5 AOBS Laser-Scanning-Mikroskop unter Verwendung eines 40x HCX APO L U-V-I Wasserimmersionsobjektives (NA = 0,8) bei 561 nm Anregungswellenlänge untersucht.

Von einem mit WGA gefärbten Schnitt wurden nach Eponeinbettung einzelne Semidünnschnitte (1 µm, Färbung nach Richardson) angefertigt (s. u.).

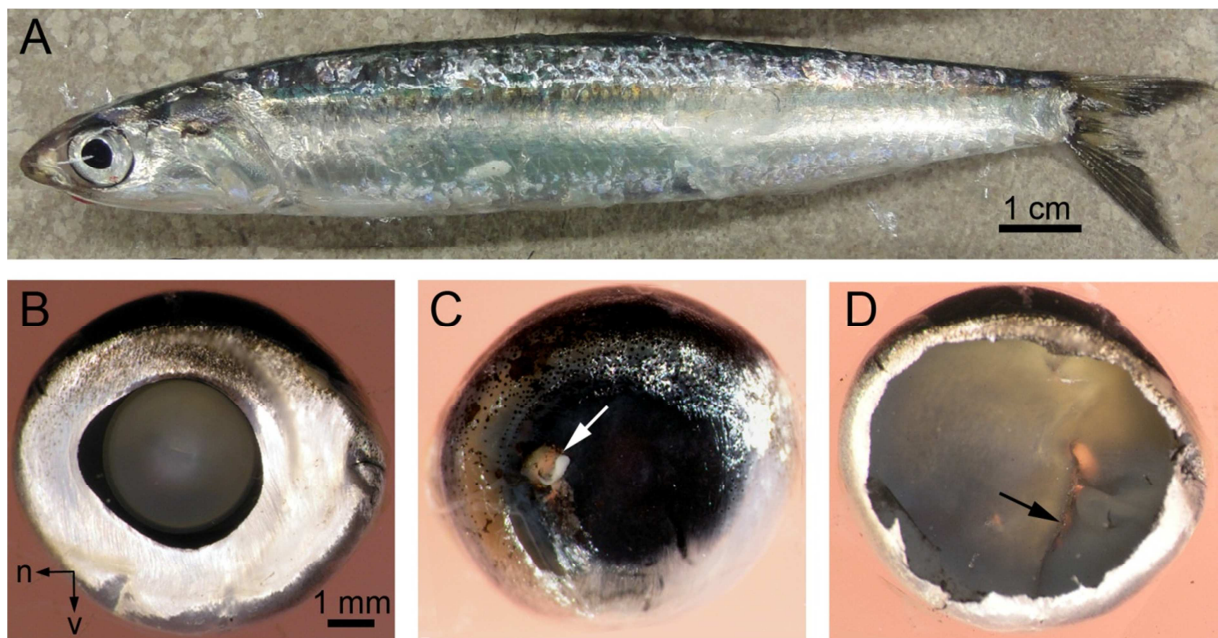


Abb. 3.1.1 Die Europäische Sardelle *Engraulis encrasicolus* und Augenpräparation.

A Fangfrisches Exemplar von *Engraulis encrasicolus*. **B** Entnommenes linkes Auge der Sardelle, Ansicht senkrecht auf die Pupille. Die Ausbuchtung der Pupille (aphakischer Raum) weist nach nasal. **n** (nasal), **v** (ventral). **C** Linkes Sardellenaugen von hinten betrachtet. Der Austritt des Sehnervs ist zu sehen (**Pfeil**). **D** Augenbecher eines linken Auges nach Entfernen von Linse und Glaskörper. Die optische Furche ist deutlich zu sehen (**Pfeil**).

Semidünnschnittserien und Lichtmikroskopie (LM)

Für die Anfertigung von Semidünnschnittserien wurden Retinafragmente des ventro-temporalen Quadranten mit 1% Osmiumtetroxidlösung (in 0,1 M PB) für 2 h auf Eis nachfixiert und in einer aufsteigenden Acetonreihe entwässert. Die Einbettung der Fragmente erfolgte im Kunstharz „Epon“ (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.1.1).

Entweder wurden Einzelschnitte angefertigt oder Schnittserien, die einem von Ruthensteiner publizierten Protokoll (Ruthensteiner, 2008; vgl. auch Campbell, 1981; Blumer et al., 2002) folgten: Semidünnschnitt-Bänder wurden mit einem HistoJumbo Diamantmesser (DiATOME) an einem MT-7000 Mikrotom (RMC) geschnitten. Hierfür wurde eine Mischung aus Klebstoff (Pattex® Compact, Henkel KGaA) und Xylol auf die Unterseite des getrimmten Eponblockes aufgetragen, damit die Schnitte aneinander haften bleiben. Die beim Schneiden entstehenden Bänder können mit einem Objektträger aus dem Wassertrog des HistoJumbo Diamantmessers gefischt werden. Nach diesem Protokoll wurde eine Radialschnittserie (Schnittdicke 1 µm) angefertigt. Um sich Schnittebenen in perfekt paralleler und senkrechter Richtung zu den Polycones anzunähern, wurde am selben Retinafragment eine Kippserie hergestellt, indem der Eponblock schnittweise um jeweils 1° gekippt wurde. An jedem Schnitt wurde die Orientierung bewertet und die Kippserie fortgesetzt, bis die Schnittorientierung genau parallel bzw. senkrecht zu den Polycones war. Das verbleibende Retinafragment wurde vom Eponblock abgesägt, und mit Sekundenkleber um 90° gedreht wieder an den Eponblock angeklebt, um von derselben Retina eine Tangentialschnittserie (1,5 µm) anzufertigen.

Die entstandenen Einzelschnitte und Schnittbänder wurden auf SuperFrost Objektträger (Roth) schwimmend aufgebracht, gestreckt und festgebacken (80°C) und mit Richardson's Reagenz (Richardson et al., 1960) bei 80°C für 10 s gefärbt.

Die Schnitte wurden an einem Olympus CX41 Lichtmikroskop mit einem 20× PlanCN Objektiv (NA = 0,4), einem 40× UPlanSApo (NA = 0,95) oder einem 60× UPlanSApo Wasserimmersionsobjektiv (NA = 1,2) untersucht. Die Aufnahme digitaler Bilder erfolgte mit einer Olympus Camedia C-5060 bei einer Auflösung von 2592 px × 1944 px.

Tabelle 3.1.1 Komponenten des Kunstharzgemisches „Epon“ (Roth).

Komponente	Menge
Glycidether 100	22,8 ml
Härter DBA	15,4 ml
Härter MNA	11,8 ml
Beschleuniger DMP 30	0,9 g

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Vom selben Vibratomschnitt (s.o. CLSM) wurden neben Semidünnschnitten auch Ultradünnschnitte angefertigt (RMC MT-7000), was einen direkten Vergleich von CLSM, LM und TEM am identischen Material erlaubt. Die Ultradünnschnitte wurden mit Bleicitrat (5 min, RT) und Uranylacetat (8 min, 40°C) kontrastiert und am FEI Morgagni 268 TEM (80 kV, Vergrößerung 5600×) mit einer Megaview 3-Digitalkamera (Soft Imaging Systems) mit einer Auflösung von 12,5 nm/ pixel digital fotografiert.

Zellkernzählung auf der Grundlage dreidimensionaler Markierung

Um die Zählung der Zellkerne verschiedener Zelltypen zu erleichtern bzw. überhaupt zu ermöglichen, wurden sie individuell markiert und dreidimensional dargestellt (siehe Abb. 3.1.2 B; Abb. 3.1.6 A). Nach vorbereitender Bildbearbeitung mit Adobe® Photoshop® 6.0 (Graustufenbilder, Autokontrast, Unschärf Maskieren) wurden die Bilderstapel einer Tangential- und zweier Teilstücke einer Radialserie (Radialserie A, B) des ventro-temporalen Quadranten in die 3D-Rendering Software Amira® eingeladen und aligniert. Jeder Nukleus, der zu mehr als 50% in einem frei definierten rechteckigen Fenster lag, wurde manuell markiert, rekonstruiert, dem entsprechenden Zelltyp zugeordnet und gezählt. Die Unterscheidung verschiedener Zell- bzw. Zellkerntypen erfolgte nach Größe, Form, Position und Färbeverhalten nach Richardson-Färbung (hier: Stäbchen, Zapfen, Bipolaren, Amakrinen; vgl. Abb. 3.1.2). Anschließend wurden die Werte in Zellen/10.000 µm² Retinafläche umgerechnet.

Das schwammartige Geflecht der IPL wurde ebenfalls mittels dreidimensionaler Rekonstruktion partiell analysiert. Hierbei wurden auffällige Bipolarterminalen-Horizonte rekonstruiert, um den Durchmesser und die Terminationstiefe der synaptischen Endigungen zu bestimmen und deren horizontales Muster zu untersuchen (Abb. 3.1.5 G, H; Abb. 3.1.6).

Zelldichteschätzung (Differential cell counting nach Trowell & Westgarth, 1959)

Um einen schnellen Überblick über die Zelldichte der lichtmikroskopisch klassifizierbaren Neuronen im ventro-temporalen Quadranten zu bekommen, wurde zunächst die Methode des „differential cell counting“ (nach Trowell & Westgarth, 1959; verändert nach O’Connell, 1963) getestet. Hierfür wurde jeder 4. Schnitt der Radialserie A (s.o.) ausgewählt, um einen direkten Vergleich mit der o.g. Methode zu ermöglichen (rot markierte Ebenen in Abb. 3.1.2 A). Die Zelldichte wurde wie folgt berechnet:

Die Anzahl der Nuklei unter einer definierten Retinafläche s^2 ist
$$N = \frac{ns^2}{r(2t + \pi r)}$$
,

wobei n die Anzahl der Nuklei ist, die von einer senkrecht durch die Retinaschichten verlaufenden Linie gekreuzt oder berührt werden, r ist der Radius eines Zellkerns und t die Schnittdicke (eine Kalibrierung der Schnittdicke konnte nicht vorgenommen werden; der Wert entspricht der vom Mikrotom angezeigten Schnittdicke). Die Werte für n wurden über sieben

Linien an einem Radialschnitt gemittelt (vgl. Abb. 3.1.2 C). Nach dieser Methode wurde die Anzahl der Zapfen, Stäbchen, Amakrinen- und Bipolarzellkerne von sechs Schnitten mit Hilfe des Programms Photoshop® ermittelt, wobei der Wert für s^2 auf $10.000 \mu\text{m}^2$ festgesetzt wurde und die Schnittdicke $t = 1 \mu\text{m}$ betrug.

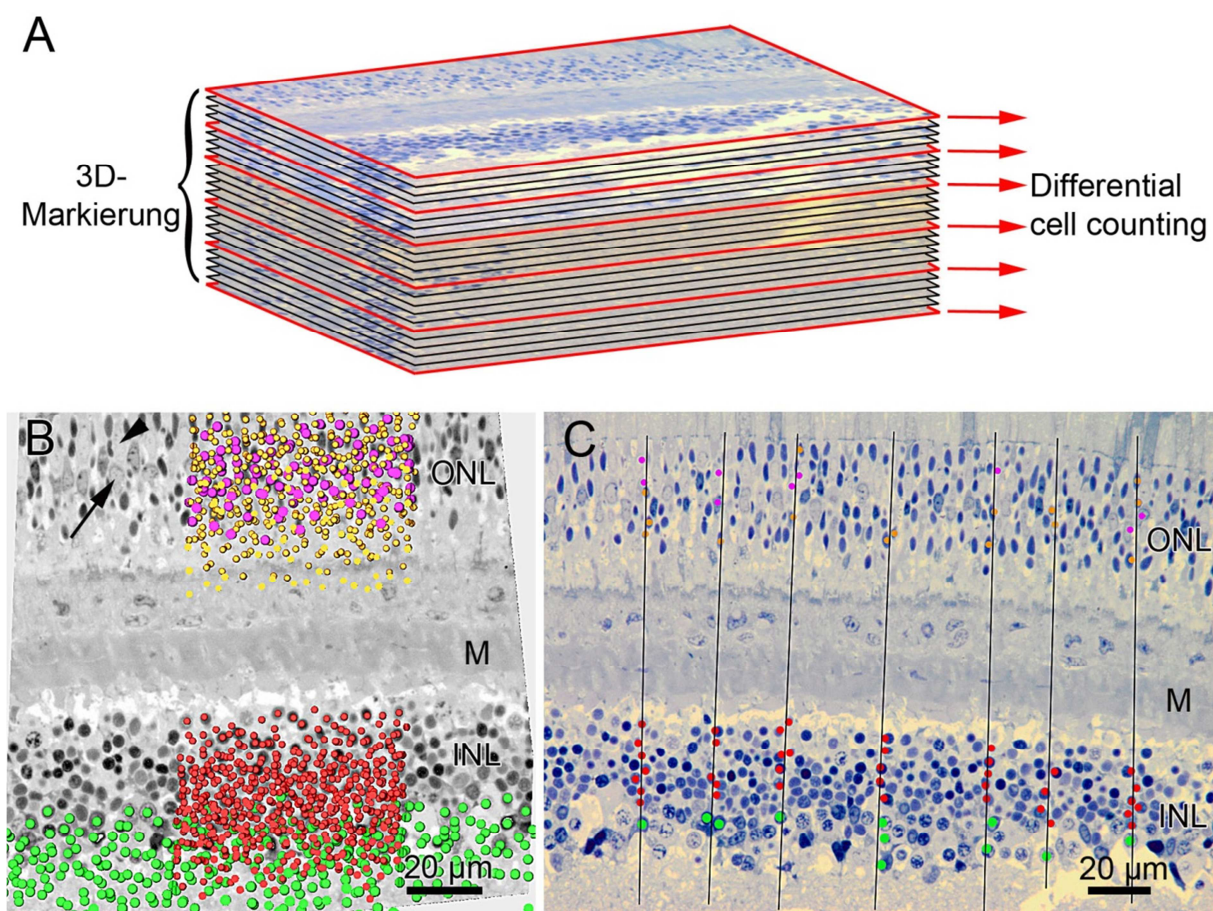


Abb. 3.1.2 Übersicht über die beiden getesteten Methoden zur Zelldichtebestimmung der Zapfen, Stäbchen, Bipolaren und Amakrinen.

INL (innere Körnerschicht), **M** (Müllerband), **ONL** (äußere Körnerschicht).

A Zur 3D-Markierung der Zellkerne wurde der gesamte Bilderstapel der Radialserie A herangezogen, das „differential cell counting“ wurde an jedem vierten Schnitt durchgeführt. **B** Für die Auszählung dreidimensional markierte (Amira®) Nuklei der Zapfen (magenta), Stäbchen (orange), Amakrinen (grün) und Bipolaren (rot). Man beachte den radialen Versatz der Nuklei der langen (**Pfeilspitze**) und kurzen Zapfen (**Pfeil**). **C** Die sieben Linien der differential-cell-counting-Methode und die berührten Nuklei der Zapfen, Stäbchen, Amakrinen und Bipolaren (Farbcodierung wie in B; Photoshop®). Nähere Erläuterungen siehe Text.

Ergebnisse

Der Fokus der lichtmikroskopisch-histologischen Untersuchungen in diesem Kapitel liegt auf der Struktur der inneren Retina (zwischen äußerer und innerer Grenzmembran) im Bereich des ventro-temporalen Quadranten. Weite Bereiche der Retina sind ähnlich organisiert, jedoch mit Abweichungen in der Zelldichte, Zellkerngröße und -verteilung, sowie in den Schichtdicken. Aufbau und Muster der äußeren Retina (skleral der äußeren Grenzmembran), das Muster der Zapfenendfüßchen (= pedicles), sowie Dichte und Muster der Horizontalzellen sind bereits untersucht worden (Heß, 2000; Heß et al., 2002) und werden an dieser Stelle der Vollständigkeit halber kurz beschrieben.

Photorezeptoren

Die lichtmikroskopische Untersuchung von Semidünnschnitten bestätigt die Struktur und Anordnung der Photorezeptoren bei Sardellen, wie sie bereits beschrieben wurde (Fineran & Nicol, 1976, 1978; Zueva, 1980; Novales Flamarique & Hawryshyn, 1998; Heß et al., 2002). Die für Sardellen typische Anordnung der langen und kurzen Zapfen in sogenannten Polycones, mit dazwischenliegenden Stäbchen, ist auch bei der hier untersuchten Art *E. encrasicolus* präsent (Abb. 3.1.3 A; Abb. 3.1.5 B).

Die keilförmigen Ausläufer des Pigmentepithels, die weit zwischen die Außensegmente der langen Zapfen reichen und die der kurzen Zapfen in zwei Loben spalten, sind auffällig (Abb. 3.1.3 A'). Bei Schnitten parallel zu den Polycones erscheinen die Keile spitz zulaufend, bei Schnittrichtung senkrecht zu den Polycones blickt man auf Anschnitte der breiten Flanken der Keile und sie erscheinen als rechteckige Flächen (vgl. Abb. 3.1.3 A mit B).

Die Nuklei der Stäbchen und Zapfen sind nach Richardson-Färbung gut zu unterscheiden: die Stäbchenkerne sind homogen und intensiv gefärbt mit einer radialen Ausdehnung von 3,2–4,5 µm und einem Durchmesser von ca. 2 µm (Abb. 3.1.2 B, C; Abb. 3.1.3 A, B). Die Zapfenkerne erscheinen heller gefärbt mit dunklerer Zellkernperipherie und sind deutlich größer (radiale Länge 7–8 µm, Durchmesser ca. 3,5 µm). Je nach Intensität der Richardson-Färbung sind gelegentlich die Nuklei der kurzen und langen Zapfen zu unterscheiden, wobei letztere heller erscheinen und skleral an die Nuklei der kurzen Zapfen anschließen (vgl. Abb. 3.1.2 B).

Die regelmäßige Anordnung der Zapfen bleibt vitreal der Kerne bis zu den Pedicles bestehen, wo sie ein Schachbrettmuster bilden (Abb. 3.1.5 C; siehe auch Heß, 2000: Kapitel 3.2.1). In den Pedicles der langen Zapfen sind nach Richardson-Färbung von 1 µm Semidünnschnitten zwei Felder von synaptischen Bändern (Ribbons) zu erkennen, deren Symmetrieachsen mittig durch den Pedicle und parallel zum Polycone verlaufen (Abb. 3.1.5 C; siehe auch Heß, 2000: Kapitel 3.2.2).

Erste Hinweise auf eine radiale Substratifizierung der Pedicles geben vereinzelte Semidünnschnitte, auf denen die Pedicles der beiden Zapfentypen nach Richardson-Färbung zu unterscheiden sind (Abb. 3.1.3 D). Da sich WGA an Membranen anlagert und sich zahlreiche postsynaptische Dendriten nahe der Ribbons befinden, sind die synaptischen Bereiche der Photorezeptoren nach WGA-Färbung auch fluoreszenzmikroskopisch darstellbar: im Radialschnitt sieht man deutlich, dass die synaptischen Bänder der kurzen Zapfen in der Area temporalis ca. 2 μm weiter vitreal lokalisiert sind als die der langen Zapfen (Abb. 3.1.4 B), was auch im tangentialen Semidünnschnitt zu erkennen ist (Abb. 3.1.5 C). Skleral der Pedicles der langen Zapfen reihen sich die Synapsen der Stäbchen traubenartig auf.

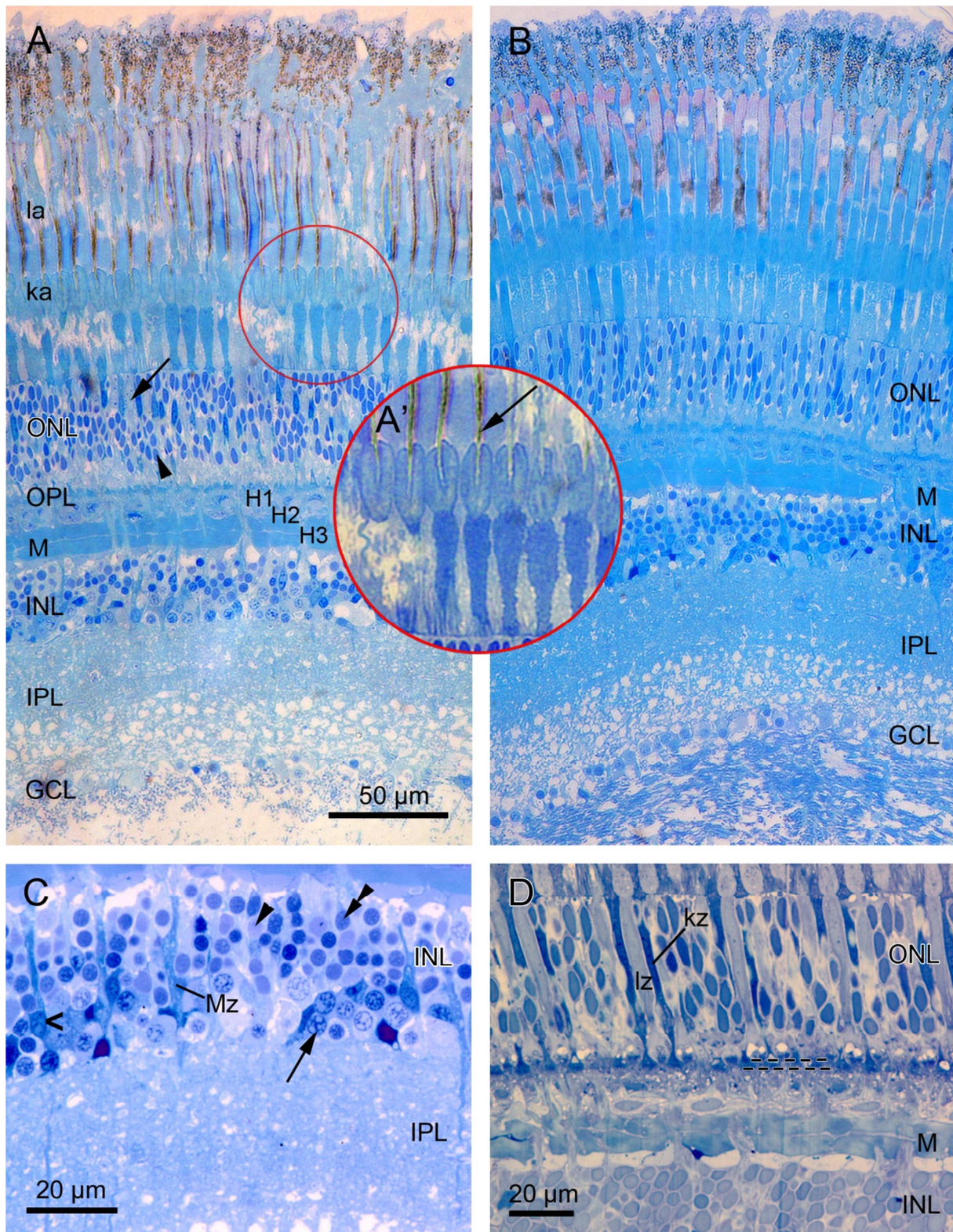
Innere Körnerschicht und Ganglienzellschicht

Die innere Körnerschicht (INL) wird durch dichtes Müllerzellmaterial in zwei distinkte Substrata geteilt, so dass die drei Typen von Horizontalzellen (H1–H3, Nomenklatur nach Heß et al., 2002) von den verbleibenden Sekundärneuronen (Bipolaren, Amakrinen) getrennt liegen (Abb. 3.1.3 A, B, D). Die am weitesten vitreal gelegenen H3 sind in das dichte Doppelstratum der Müllerfasern („Müllerband“; Dicke ca. 12 μm) eingebettet, wodurch ihre Zellkerne radial stark abgeflacht werden (radialer Durchmesser ca. 2 μm). Im tangentialen Anschnitt erscheinen sie dagegen \pm oval mit einer langen Achse von 7,5–9,7 μm und einer kurzen Achse von 5,1–6,5 μm . Im ventro-temporalen Quadranten spannen die Kerne der H1 (skleral) und H2 (weiter vitreal) zwei deutlich voneinander getrennte Ebenen auf, die radial bis zu 6,7 μm auseinander liegen können. Mit einer horizontalen Ausdehnung von 6–7 μm sind die Kerne der H1 etwas kleiner als die der H2 (7–8 μm). Beide Kerntypen sind relativ gleichmäßig verteilt, mit einer Nächster-Nachbar-Distanz von 7–10 μm (Abb. 3.1.5 D), folgen aber in ihrem Muster nicht den Polycones (s. Heß et al., 2002: Abb. 4 A).

Abb. 3.1.3 Radiale Semidünnschnitte der Sardellenretina, Richardson-Färbung. ►

GCL (Ganglienzellschicht), **H1–3** (Horizontalzellen 1–3), **INL** (innere Körnerschicht), **IPL** (innere plexiforme Schicht), **ka** (Außenglieder der kurzen Zapfen), **kz** (kurzer Zapfen), **la** (Außenglieder der langen Zapfen), **lz** (langer Zapfen), **M** (Müllerband), **Mz** (Müllerzelle), **ONL** (äußere Körnerschicht), **OPL** (äußere plexiforme Schicht).

A Radialschnitt durch die gesamte Neuroretina parallel zu den Polycones. Man beachte die Schichtung der Zellnuklei und die der IPL, sowie die in Polycones angeordneten Zapfen. Der **Pfeil** markiert einen Zapfenkern, die **Pfeilspitze** einen Stäbchenkern. **A'** Detail aus A; kurze Zapfen eines Polycones; Außensegmente sind durch Pigmentepithelkeile (**Pfeil**) in zwei Loben gespalten. **B** Radialschnitt durch die gesamte Neuroretina senkrecht zu den Polycones.



C Radialschnitt durch die Retina im Bereich der INL und IPL. Nach Richardson-Färbung lassen sich in der INL *sensu stricto* drei Typen von Zellkernen unterscheiden: stark (**doppelte Pfeilspitze**) und schwach gefärbte Bipolarkerne (**Pfeilspitze**) in der skleralen Hälfte der INL, sowie große, granulierte Amakrinenkerne (**Pfeil**) in der vitrealen Hälfte der INL. Gelegentlich sind gefärbte Müllerzellen (**Mz**) samt Kernen (<) zu erkennen. **D** Radialschnitt durch die Retina im Bereich der OPL. Nach Richardson-Färbung lassen sich lange (hell, **lz**) und kurze Zapfen (dunkel, **kz**) unterscheiden. Die Pedicles der kurzen Zapfen terminieren weiter vitreal als die der langen Zapfen (**gestrichelte Linien**).

Die dicht gepackten Bipolar-, Amakrinen- und Müllerzellkerne bilden die INL *sensu stricto*, im Folgenden INL genannt. Anhand der Größe, Lage und des Färbeverhaltens nach Richardson-Färbung kann eine grobe Unterscheidung dieser Zellkerne im ventro-temporalen Quadranten vorgenommen werden (Abb. 3.1.3 C):

1. Intensiv blau gefärbte, kugelige, \pm homogene Bipolarkerne, Durchmesser 3–4 μm , sklerale Hälfte der INL
2. Schwach gefärbte, \pm kugelige, homogene Bipolarkerne, Durchmesser 3–4 μm , sklerale Hälfte der INL
3. Große, heterogen granulierte, kugelige Amakrinenkerne (inklusive Müllerzellkerne), Durchmesser 4,5–7 μm , vitreale Hälfte der INL

Vereinzelt sind die Kerne in die jeweils andere Hälfte der INL eingestreut.

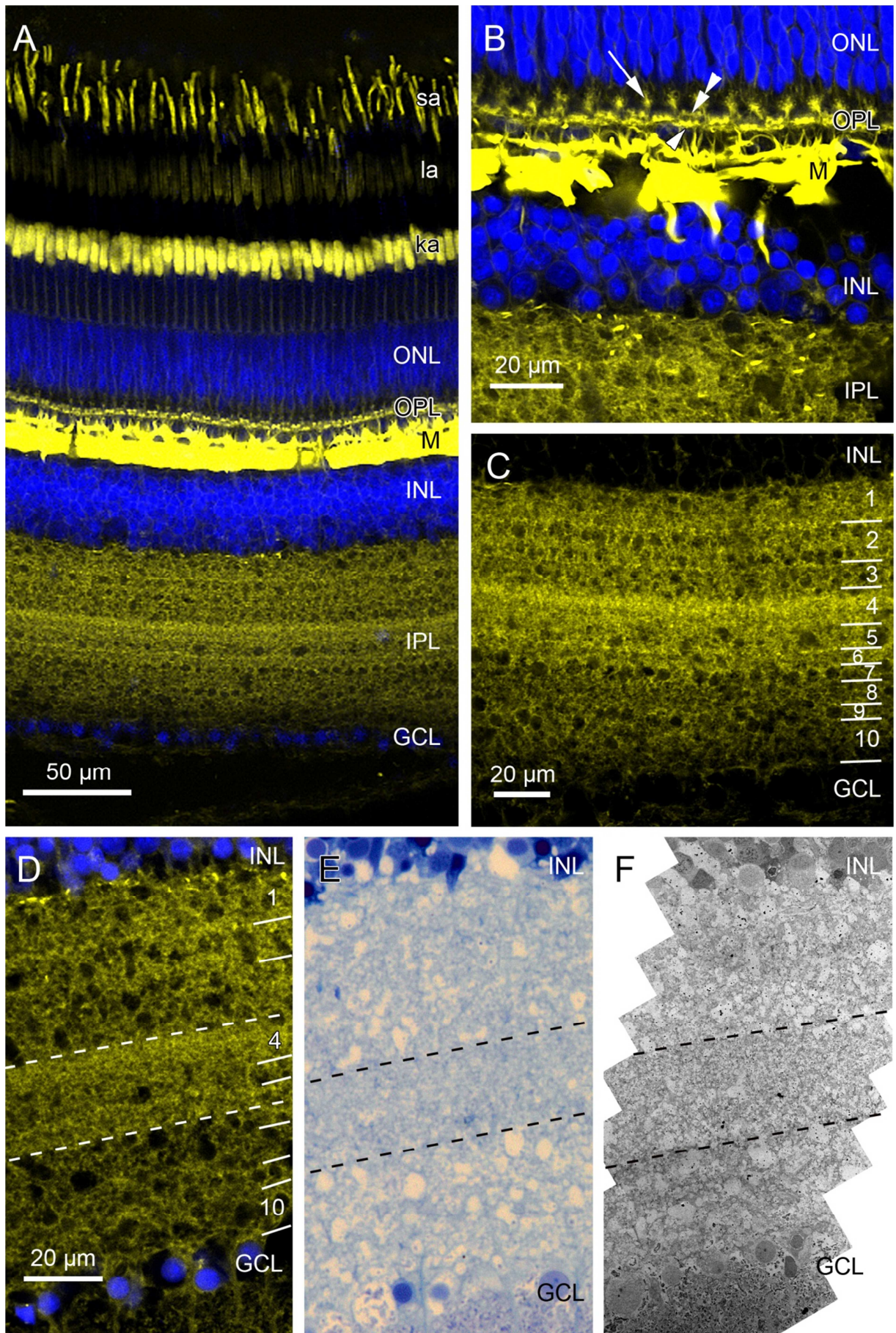
Neben Bipolar- und Amakrinenkerne können auf einigen Schnitten Müllerzellkerne identifiziert werden, da die Müllerzellsomata gelegentlich angefärbt sind (Abb. 3.1.3 C). Die Kerne sind heterogen granuliert, haben eine Länge (radial) von ca. 5,6 μm und eine Breite (horizontal) von ca. 3,6 μm und liegen zwischen den Amakrinenkernen an der vitrealen Seite der INL.

Die Ganglienzellkerne sind im Wesentlichen einschichtig angeordnet (Abb. 3.1.3 A, B; Abb. 3.1.4 A, D–F), nur in Bereichen sehr hoher Dichte liegen sie auch gestaffelt. Sie sind sphärisch bis oval mit Durchmessern von 4–7 μm mit variabler Kernbinnenstruktur (Abb. 3.1.5 I).

Abb. 3.1.4 Konfokalbilder der Sardellenretina (A–D; WGA-Färbung; Hellste-Punkt-Projektionen mehrerer optischer Schnittebenen), sowie Gegenüberstellung von Konfokal-, lichtmikroskopischem und TEM-Bild am identischen Gewebevolumen (D–F). ►

GCL (Ganglienzellschicht), **INL** (innere Körnerschicht), **IPL** (innere plexiforme Schicht), **ka** (Außenglieder der kurzen Zapfen), **la** (Außenglieder der langen Zapfen), **M** (Müllerband), **ONL** (äußere Körnerschicht), **OPL** (äußere plexiforme Schicht), **sa** (Außenglieder der Stäbchen).

A Konfokalbild eines radial geführten Vibratomschnittes durch die gesamte Neuroretina senkrecht zum Verlauf der Polycones. WGA lagert sich an Zellmembranen/Tubuli an, dadurch sind das Müllerband (**M**) und die Außenglieder der kurzen (**ka**) und langen Zapfen (**la**) besonders stark gefärbt. Die Schichtung der IPL ist gut zu erkennen. **B** Konfokalbild eines Vibratomschnittes durch ONL bis IPL. Durch WGA-Färbung werden die synaptischen Zonen der Photorezeptoren sichtbar. Man beachte den radialen Versatz der synaptischen Bänder von kurzen (**Pfeilspitze**) und langen Zapfen (**doppelte Pfeilspitze**). Die synaptischen Bänder der Stäbchen liegen traubenartig weiter skleral (**Pfeil**). **C** Konfokalbild durch die IPL (Radialschnitt). Durch abwechselnde Horizonte dichter Fasern und sphärischer Axonterminalen wird die IPL in 10 Substrata geteilt. Nähere Erläuterungen siehe Text. **D** Konfokaloalbild durch die WGA-gefärbte IPL. Die 10 Substrata sind gut zu unterscheiden. **E** Radialer Semidünnschnitt desselben Retinavolumens wie in D. Eine Dreiteilung der IPL ist zu erkennen, abhängig von der Dichte der Fasern. **F** Elektronenmikroskopische Aufnahme desselben Retinavolumens wie in D und E, mit erkennbarer Dreiteilung der IPL.



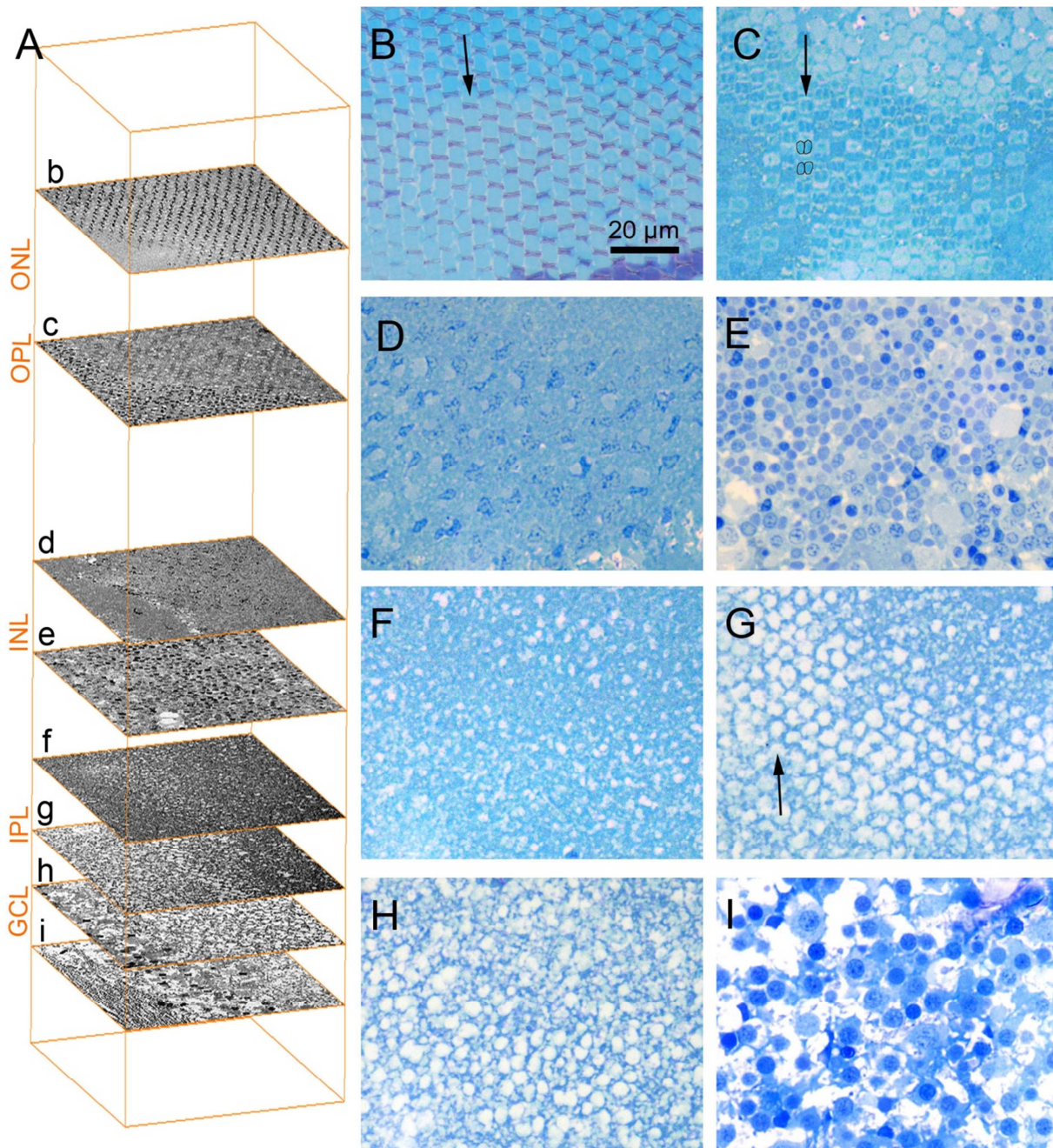


Abb. 3.1.5 Tangentiale Semidünnschnitte durch die Sardellenretina, Richardson-Färbung.

GCL (Ganglienzellschicht), **INL** (innere Körnerschicht), **IPL** (innere plexiforme Schicht), **ONL** (äußere Körnerschicht), **OPL** (äußere plexiforme Schicht).

A BoundingBox (orange) des gesamten Bilderstapels einer tangentialen Semidünnschnittserie (Amira®) durch die gesamte Neuroretina. Die Lage der Schnittbilder B–I ist angegeben (b–i). **B** Ellipsoide der langen Zapfen mit dazwischenliegenden Anschnitten der Pigmentepithelkeile. Der Pfeil markiert die Verlaufsrichtung eines Polycones. **C** Schachbrettartig angeordnete Zapfenendfüßchen (Pedicles) der langen Zapfen. Diese weisen zwei parallel zum Polycone verlaufende Felder von synaptischen Bändern auf (an zwei Zapfen hervorgehoben). Der Pfeil markiert die Verlaufsrichtung eines Polycones. **D** Zellkerne der Horizontalzellen 1 und 2. **E** Innere Körnerschicht sensu stricto. **F** Aus relativ dichtem Fasergeflecht bestehendes Substratum 3 der IPL mit eingestreuten größeren Bipolarterminalen. **G** Schachbrettartig angeordneter Bipolarterminalen-Horizont des Substratums 7. Der Pfeil markiert die Verlaufsrichtung eines Polycones bzw. das Reihemuster der Bipolarterminalen. **H** Substratum 9–10 der IPL. **I** Kerne der Ganglienzellschicht.

Zelldichte

Um die Anzahl der Zellkerne nach Trowell & Westgarth (1959) zu ermitteln, wurden sechs Schnitte der Radialserie A (ventro-temporalen Quadranten) mit Abstand 4 μm ausgewählt. Die errechnete Zapfendichte (Tabelle 3.1.2) bewegt sich im Bereich von 284 bis 377 Zellen/10.000 μm^2 (mittlerer Kerndurchmesser 3,5 μm), die Stäbchendichte von 1466 bis 2242/10.000 μm^2 (mittlerer Kerndurchmesser 2 μm). Die Zelldichte für die Bipolarkerne mit einem mittleren Durchmesser von 3,4 μm liegt zwischen 1136 und 1359/10.000 μm^2 , für die Amakrinen ergeben sich Werte im Bereich von 181 bis 334/10.000 μm^2 (mittlerer Kerndurchmesser 5 μm).

Nach 3D-Markierung und Kernzählung liegt die Kerndichte für dieselbe Radialserie A für die Sekundärneuronen etwa 2,5-fach höher (3102 Bipolaren, 876 Amakrinen). Auch für die Zapfen wurden etwa 1,7-fach höhere Werte gezählt (530), die Stäbchenzählung ergab in etwa gleiche Werte wie die Kernschätzung (2273).

An einer zweiten Radialserie desselben Retinastückes wurde eine Bipolardichte von 3214, eine Amakrinendichte von 900/10.000 μm^2 gezählt. Bei der Tangentialserie liegen die ermittelten Werte bei 625 Zapfen, 1780 Stäbchen, 2891 Bipolaren und 659 Amakrinen/10.000 μm^2 .

Tabelle 3.1.2 Ergebnisse der Zellkernschätzung bzw. -zählungen (Werte sind Anzahl der Zellen pro 10.000 μm^2).

	Zapfen	Stäbchen	Bipolaren	Amakrinen
„Differential cell counting“				
Radialserie A	377	1983	1183	334
	283	2242	1229	192
	283	1293	1252	181
	314	1811	1229	334
	283	2156	1136	181
	345	1466	1359	334
Mittelwert	314	1825	1231	259
Zellkernzählung mittels 3D-Markierung				
Radialserie A	530	2273	3102	876
Radialserie B	--	--	3214	900
Tangentialserie	625	1780	2891	659

Innere plexiforme Schicht (IPL)

Die IPL ist im ventro-temporalen Quadranten der Retina vom vitrealen Rand der INL bis zum skleralen Rand der GCL ca. 60–86 µm mächtig. Semidünnschnitte und Vibratomschnitte nach Fluoreszenzfärbung zeigen die IPL als Gesamtgeflecht aus Axonen, Axonterminalen und Dendriten von Bipolaren, Amakrinen und Ganglienzellen, sowie den Somata von Müllerzellen (Abb. 3.1.3 A, B; Abb. 3.1.4). Eine erkennbare Schichtung der IPL ergibt sich aus Horizonten feinerer und gröberer Textur. Die feinen Horizonte entstehen aus Schichten mit starker horizontaler Arborisierung mit hohem Volumenanteil feiner Fasern, die groben Horizonte enthalten voluminöse Axonterminalen, die nach Behandlung mit Richardson-Reagenz oder WGA ungefärbt bleiben. Im Radialschnitt wird diese Stratifizierung sichtbar (Abb. 3.1.3; Abb. 3.1.4), in einer tangentialen Schnittserie können horizontale Muster einzelner Strata erkannt werden (Abb. 3.1.5 F–H; Abb. 3.1.7).

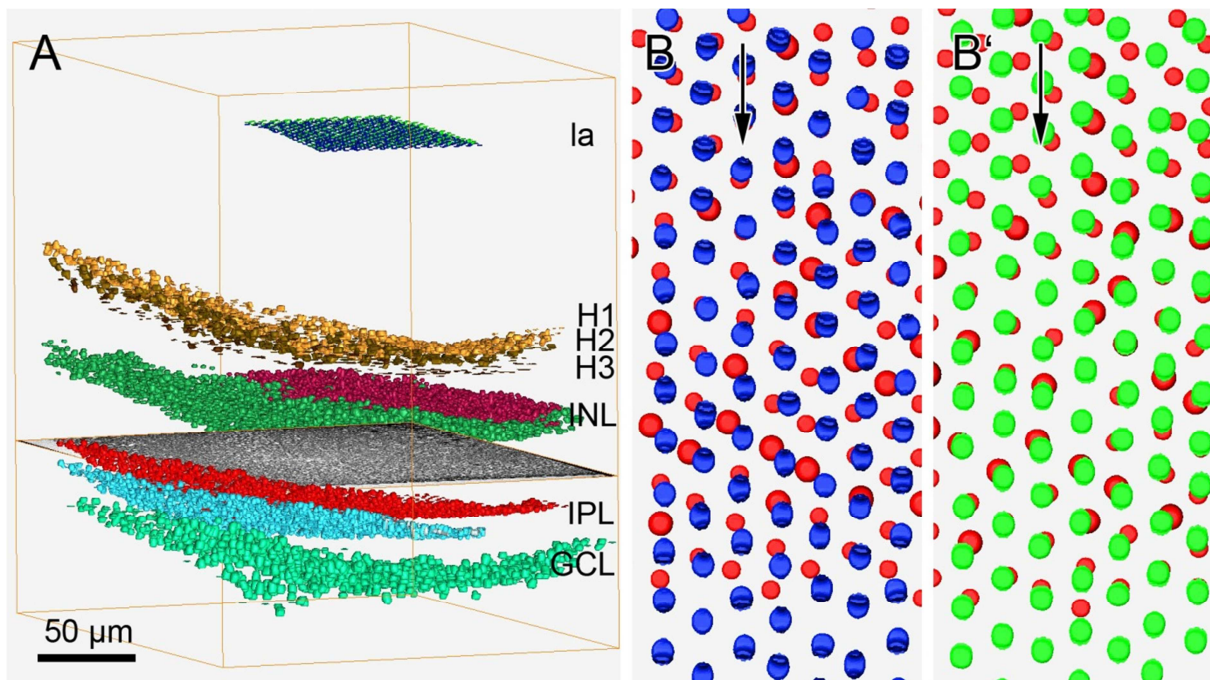


Abb. 3.1.6 3D-Rekonstruktion (Amira®) ausgesuchter Horizonte der Sardellenretina.

GCL (Ganglienzellschicht), **H1–3** (Horizontalzellen 1–3), **INL** (innere Körnerschicht), **IPL** (innere plexiforme Schicht), **la** (Außenglieder der langen Zapfen).

A Die rekonstruierten Kernhorizonte der INL (H1–3: orange-braun, Bipolaren: magenta, Amakrinen: grün) und GCL (türkis), sowie Bipolarterminalenhorizonte der IPL (Substratum 7: rot, Substratum 9: hellblau) und Außenglieder der Zapfen (**la**) im untersuchten Retinavolumen (Bounding-Box, oranger Rahmen; Schnittebene eingefügt auf Höhe der IPL). **B** Überlagerung der markierten Außenglieder der langen Zapfen (blau) mit den Bipolarterminalen des Substrats 7 (rot). Blickrichtung von skleral, so dass die Zapfenaußenglieder die Bipolarterminalen teilweise verdecken. Die Reihenanzahl der Polycones (Verlauf in **Pfeil**richtung) stimmt mit der Reihenanzahl des Terminalenhorizontes überein, die Frequenz der Terminalen entspricht 50% der Zapfenfrequenz (=Frequenz eines Zapfentyps). **B'** Überlagerung der rekonstruierten Außenglieder der kurzen Zapfen (grün) mit den Bipolarterminalen des Substrats 7 (rot).

Am radialen Semidünnschnitt kann in lichtmikroskopischer Auflösung eine grobe Dreiteilung der IPL vorgenommen werden (Abb. 3.1.3 A, B; Abb. 3.1.4 E): die Textur des skleralen Drittels (Mächtigkeit 32,4 μm bei Gesamtdicke der IPL von 86 μm) erscheint von „mittlerer Dichte“, gefolgt von einem Drittel mit sehr dichtem Fasergeflecht (Dicke 22,4 μm), das vitreale Drittel (Dicke 31,2 μm) ist lockerer, mit zahlreichen größeren Axonterminalen. Konfokalmikroskopische Bilder, aber auch tangentielle Semidünnschnitte liefern ein sehr viel differenzierteres Bild der IPL-Stratifizierung mit insgesamt 10 Substrata (Abb. 3.1.4 A, C, D; Abb. 3.1.7).

Das sklerale Drittel der IPL wird durch zwei schmale Bänder aus dichten Fasern in die Substrata 1–3 geteilt. Zudem ist am skleralen und vitrealen Rand des Substrats 2 jeweils ein begrenzender Horizont aus \pm kugeligen Bipolarterminalen zu erkennen (Durchmesser ca. 3 μm ; Abb. 3.1.4 C). Diese befinden sich in einer Gesamttiefe der IPL – vom vitrealen Rand der INL aus gemessen – von 14,7 μm (zwischen Substratum 1 und 2) bzw. 21,7 μm (zwischen Substratum 2 und 3).

In das mittlere dichte Drittel der IPL sind in der vitrealen Hälfte große Bipolarterminalen eingestreut (Gesamttiefe in der IPL ca. 45 μm), deren mittlerer Durchmesser bei 5 μm liegt. Dieses Substratum 5 wird skleral und vitreal von den dichten Substrata 4 und 6 umrahmt, wobei Substratum 4 deutlich mächtiger ist (12 μm vs. 7 μm). Substratum 7 wird von einem Horizont höchst regelmäßig angeordneter Bipolarterminalen gebildet (Durchmesser ca. 4 μm ; Tiefe 56,6 μm ; Abb. 3.1.4 C). Im Tangentialschnitt wird das Reihemuster der Terminalen sichtbar (Abb. 3.1.5 G), das dem Muster der Polycones folgt. Die dreidimensionale Rekonstruktion des Terminalen-Horizontes und der Zapfenaußenglieder zeigt, dass die Reihenanzahl der Terminalen und der Polycones übereinstimmt und die Dichte der Bipolarterminalen nur 50% der Zapfendichte ausmacht (Abb. 3.1.6 B, B'). Zwischen dem anschließenden lockeren Substratum 8 und teilweise ungeordnet erscheinenden Geflecht des Substrats 10 der IPL ist ein regelmäßigerer Horizont aus größeren und dichter gepackten Bipolarterminalen (Durchmesser 4–5 μm ; Tiefe ca. 72 μm) zu erkennen (Substratum 9; Abb. 3.1.5 H; Abb. 3.1.7).



Abb. 3.1.7 Schiefschnitt durch die innere plexiforme Schicht.

GCL (Ganglienzellschicht), **GF** (Ganglienfaserschicht), **INL** (innere Körnerschicht). Die 10 Substrata der IPL sind gut zu erkennen. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Diskussion

Der histologische Aufbau der Sardellenretina entspricht dem Grundplan der Vertebratenretina (z.B. Dowling, 1987) und naturgemäß dem der Fischretina (z.B. Ali & Anctil, 1976).

Zur Histologie der Sardellenretina (Gattung *Engraulis*) finden sich einzelne publizierte Abbildungen (z.B. Zueva, 1980; Heß et al., 2006; Novales Flamarique, 2011), der Aufbau der inneren Retina wird dabei jedoch nur partiell beschrieben. Die hier gezeigten Befunde bestätigen und erweitern das bisherige histologische Bild von der Struktur der inneren Retina von *E. encrasicolus*, nicht zuletzt durch die Ausweitung einer zweidimensionalen auf eine dreidimensionale Herangehensweise und die Kombination von konventioneller Semi-dünnschnitt-Histologie mit Konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie am fluoreszenzgefärbten Schnitt.

Die genaue Betrachtung der **Photorezeptoranteile** (Somata, Axone und Terminalen der Zapfen) in der inneren Retina zeigt die Fortsetzung des radialen Versatzes von langen und kurzen Zapfen auf allen Ebenen. Besonders bemerkenswert ist dabei die bereits von Heß et al. (2002) beschriebene Organisation der äußeren plexiformen Schicht (OPL) mit radialem Versatz und horizontalem Schachbrettmuster der Zapfenpedicles (und somit der synaptischen Zonen) und die regelmäßig angeordneten synaptischen Kontaktfelder. Diese räumliche Trennung der Verschaltungshorizonte ist als erster Hinweis auf eine regelhafte Verschaltung zu werten, sowohl zelltypspezifisch (streckenweise Kanaltrennung), als auch geometrisch geordnet.

Eine augenfällige Besonderheit von *E. encrasicolus* ist das **Müllerband**, das die Horizontalzellen von den restlichen Sekundärneuronen separiert und somit die INL in zwei distinkte Schichten teilt. Während bei Mammalia keine deutliche Separation der H-Zellen von den restlichen Sekundärneuronen erfolgt (z.B. Makake: Burris et al., 2002; Hörnchen: Cuenca et al., 2002; Review in Wässle, 2004), scheint sie unter Teleostei verbreitet zu sein (z.B. Parthe, 1972; Ali & Anctil, 1976; Dowling et al., 1985). Eine Trennung durch ein definiertes Müllerband tritt in der näheren Verwandtschaft von *E. encrasicolus* auf (Engraulidinae: Heß, 2000), findet sich aber – zumindest ansatzweise – auch bei anderen Teleostei (z.B. *Roccus crysops*: Vaughan & Lasater, 1990).

Die **Horizontalzellen** von Fischen sind in der Regel in 2–4 abgesetzten Schichten angeordnet, wobei jede auch funktionell distinkt ist (Stell et al., 1982; Linser et al., 1985). Diese funktionelle Trennung der Horizontalen ergibt sich durch ihre Konnektivität: die am weitesten

vitreal gelegenen Horizontalen kontaktieren die Stäbchen, während die weiter skleral gelegenen synaptische Kontakte zu den Zapfen ausbilden (Parthe, 1972; Dowling et al., 1985).

Eine konventionelle **Klassifizierung** der INL-Neuronen, wie schon von O'Connell (1963) demonstriert und von Heß et al. (2002) verfeinert, wurde nachvollzogen, wobei man schnell auf Grenzen und Uneindeutigkeiten stößt. So variieren Kerndurchmesser in gewissen Grenzen graduell, die Kernbinnenstruktur ist bei lichtmikroskopischer Auflösung nicht genau erkennbar und Schnittdicken von 1–1,5 µm beinhalten z.T. große Struktursprünge zwischen Nachbarschnitten (Probleme beim Alignment!). Das Verfahren der Zellkerndichteschätzung nach O'Connell (1963) erscheint durch den Vergleich mit einer viel genaueren (wenn auch arbeitsaufwändigen) Zellkernzählung in 3D insuffizient, da (v.a. große) Zellkerne nicht homogen verteilt vorliegen (Ausnahme: Stäbchenkerne in hoher Dichte und mit gleichmäßiger Struktur).

Eine genaue morphologische Beschreibung der **IPL-Schichtung** in lichtmikroskopischer Auflösung (Hellfeld-Lichtmikroskopie, CLSM) zeigt auch hier eine wiederkehrende, regelmäßige Anordnung neuronaler Elemente, was für Teleostierretinae offenbar typisch ist: schachbrettartig angeordnete Bipolarterminalen wie im Substratum 7 bei *E. encrasicolus*, die das Muster der Zapfen widerspiegeln, finden sich auf lichtmikroskopischem Niveau auch z.B. bei *Trachurus mediterraneus ponticus* (Podugolnikova, 1985) und *Callionymus lyra* (Goodland, 1966; Haesendonck & Missotten, 1983). Auch die abwechselnd auftretende Differenzierung der IPL in P-Schichten („pattern“ aus Bipolarterminalen) und F-Schichten („fibrous“; Nomenklatur nach Haesendonck & Missotten, 1983) ist bei *E. encrasicolus* präsent (Abb. 3.1.4 C) und findet sich auch bei anderen Teleostei (*Cottus bubalis*: Goodland, 1966; versch. Familien: Selván de Testa, 1966; *Astronotus ocellatus*: Hibbard, 1971). Die direkte Gegenüberstellung von Hellfeld-Lichtmikroskopie, CLSM und Elektronenmikroskopie am identischen Gewebevolumen (Abb. 3.1.4 D–F) zeigt einen eher geringen Informationsgewinn durch die Elektronenmikroskopie, da beim hochauflösenden Blick auf sämtliche Faseranschnitte der IPL die 10 Substrata nicht mehr differenziert werden können. Eine Strukturierung der IPL nach tatsächlichen Bipolarterminalen-Horizonten kann mit neuroanatomischen Färbungen gelingen (Golgi: Sherry & Yazulla, 1993; DiOlistic: Connaughton et al., 2004; Immunhistochemie: Haverkamp et al., 2003).

Die Stratifizierung der IPL deutet auf eine selektive Verschaltung von Neuronen-Subpopulationen zur Verrechnung bestimmter Informationsanteile des neuroelektrischen Umweltbildes in der inneren Retina. Horizontale Muster hingegen, deuten auf topologische, geordnete Weiterführung des Photorezeptorzellmusters und lassen teilweise Konvergenz erkennen.

Eine verlässliche Klassifizierung der Retinaneuronen, die Kenntnis ihrer topografischen Verteilung gepaart mit neuroanatomischen und ultrastrukturellen Befunden ist letztendlich notwendig, um die Retina als Bildverarbeitungsrechner besser verstehen zu können.

Literatur

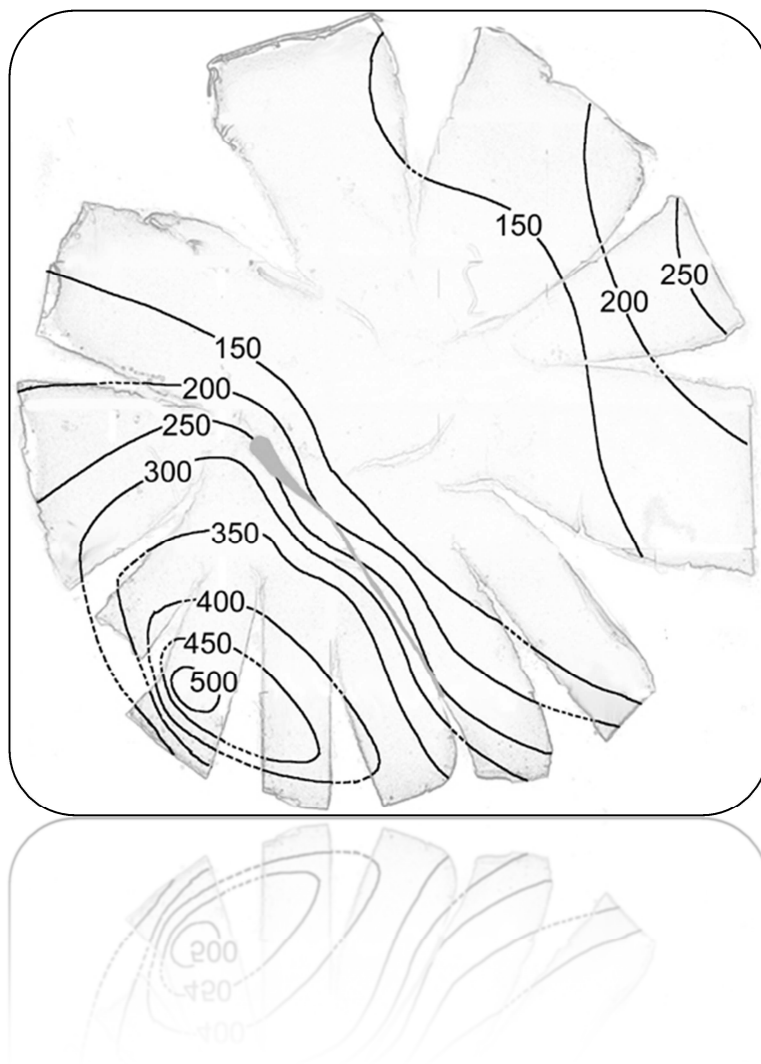
- Ali MA & Anctil M (1976). Retinas of fishes – an atlas. *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York*. 294 S.
- Blumer MJF, Gahleitner P, Narzt T, Handl C & Ruthensteiner B (2002). Ribbons of semithin sections: an advanced method with a new type of diamond knife. *Journal of Neuroscience Methods* 120: 11–16.
- Burris C, Klug K, Ngo IT, Sterling P & Schein S (2002). How Müller glial cells in macaque fovea coat and isolate the synaptic terminals of cone photoreceptors. *Journal of Comparative Neurology* 453: 100–111.
- Campbell RD (1981). A method for making ribbons of semithin plastic sections. *Stain Technology* 56: 247–249.
- Connaughton VP, Graham D & Nelson R (2004). Identification and morphological classification of horizontal, bipolar, and amacrine cells within the zebrafish retina. *Journal of Comparative Neurology* 477: 371–385.
- Cook JE & Noden AJ (1998). Somatic and dendritic mosaics formed by large ganglion cells in the retina of the common house gecko (*Hemidactylus frenatus*). *Brain, Behavior and Evolution* 51: 263–283.
- Cuenca N, Deng P, Linberg KA, Lewis GP, Fisher SK & Kolb H (2002). The neurons of the ground squirrel retina as revealed by immunostains for calcium binding proteins and neurotransmitters. *Journal of Neurocytology* 31: 649–666.
- Dowling JE (1987). The retina. *Harvard University Press, Cambridge*. 282 S.
- Dowling JE, Pak MW & Lasater EM (1985). White perch horizontal cells in culture: methods, morphology and process growth. *Brain Research* 360: 331–338.
- Eigenmann CH & Shafer CD (1900). The mosaic of single and twin cones in the retina of fishes. *The American Naturalist* 34: 109–118.
- Engström K (1963). Cone types and cone arrangements in teleost retinæ. *Acta Zoologica* 44: 179–243.
- Fineran VA & Nicol JAC (1976). Novel cones in the retina of the anchovy (*Anchoa*). *Journal of Ultrastructure Research* 54: 296–303.
- Fineran VA & Nicol JAC (1978). Studies on the photoreceptors of *Anchoa mitchilli* and *A. hepsetus* (Engraulidae) with particular reference to the cones. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 283: 25–60.
- Goodland H (1966). The ultrastructure of the inner plexiform layer of the retina of *Cottus bubalis*. *Experimental Eye Research* 5: 198–200.

- Haacke C, Heß M, Melzer RR, Gebhart H & Smola U (2001). Fine structure and development of the retina of the grenadier anchovy *Coilia nasus* (Engraulidae, Clupeiformes). *Journal of Morphology* 248: 41–55.
- Haesendonck E, van & Missotten L (1979). Synaptic contacts of the horizontal cells in the retina of the marine teleost, *Callionymus lyra* L. *Journal of Comparative Neurology* 184: 167–192.
- Haesendonck E, van & Missotten L (1983). Stratification and square pattern arrangements in the dorsal inner plexiform layer in the retina of *Callionymus lyra* L. *Journal of Ultrastructure Research* 83: 296–302.
- Haverkamp S, Ghosh K, Hirano A & Wässle H (2003). Immunocytochemical description of five bipolar cell types of the mouse retina. *Journal of Comparative Neurology* 455: 463–476.
- Heß M (2000). Vergleichend feinstrukturelle Untersuchungen an der Netzhaut der Europäischen Sardelle *Engraulis encrasicolus* L. (Engraulidae) und den Retinae anderer Clupeiformes. *Dissertation an der Fakultät für Biologie, LMU München*.
- Heß M (2009). Triple cones in the retinas of three anchovy species: *Engraulis encrasicolus*, *Cetengraulis mysticetus* and *Anchovia macrolepidota* (Engraulidae, Teleostei). *Vision Research* 49: 1569–1582.
- Heß M, Melzer RR, Eser R & Smola U (2006). The structure of anchovy outer retinas (Engraulidae, Clupeiformes) – A comparative light- and electron-microscopic study using museum-stored material. *Journal of Morphology* 267: 1356–1380.
- Heß M, Melzer RR & Smola U (2002). The pattern of cone pedicles and horizontal cells in the retina of the European anchovy, *Engraulis encrasicolus* L. (Engraulidae, Clupeiformes). *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 34: 355–365.
- Hibbard E (1971). Grid patterns in the retinal organization of the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. *Experimental Eye Research* 12: 175–180.
- Linser PJ, Smith K & Angelides K (1985). A comparative analysis of glial and neuronal markers in the retina of fish: variable character of horizontal cells. *Journal of Comparative Neurology* 237: 264–272.
- Lyall AH (1957). Cone arrangements in teleost retina. *Quarterly Journal of Microscopic Science* 98: 189–201.
- Novales Flamarique I (2011). Unique photoreceptor arrangements in a fish with polarized light discrimination. *Journal of Comparative Neurology* 519: 714–737.
- Novales Flamarique I & Hawryshyn CW (1998). Photoreceptor types and their relation to the spectral and polarization-sensitivities of clupeid fishes. *Journal of Comparative Physiology A* 182: 793–803.
- O'Connell CP (1963). The structure of the eye of *Sardinops caerulea*, *Engraulis mordax*, and four other pelagic marine teleosts. *Journal of Morphology* 113: 287–329.
- Parthe V (1972). Horizontal, bipolar and oligopolar cells in the teleost retina. *Vision Research* 12: 395–398.
- Podugolnikova TA (1985). Morphology of bipolar cells and their participation in spatial organization of the inner plexiform layer of jack mackerel retina. *Vision Research* 25: 1843–1851.

- Podugolnikova TA & Maksimov VV (1975). Morphological types of bipolar cells identified by regular grids of their axonal expansions in the inner plexiform layer of the herring retina. *Neurophysiology* 7: 47–51.
- Richardson KC, Jarett L & Finke EH (1960). Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technology* 35: 313–323.
- Ruthensteiner B (2008). Soft part 3D visualization by serial sectioning and computer reconstruction. *Zoosymposia* 1: 63–100.
- Selvin de Testa A (1966). Morphological studies on the horizontal and amacrine cells of the teleost retina. *Vision Research* 6: 51–52.
- Sherry DM & Yazulla S (1993). GABA and glycine in retinal amacrine cells: Combined Golgi impregnation and immunocytochemistry. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 342: 295–320.
- Stell WK, Kretz R & Lightfoot DO (1982). Horizontal cell connectivity in goldfish. In: Drujan BD & Laufer M (eds): The S-Potential. *Alan R. Liss, Inc., New York*. S. 51–75.
- Stell WK & Lightfoot DO (1975). Color-specific interconnections of cones and horizontal cells in the retina of the goldfish. *Journal of Comparative Neurology* 159: 473–502.
- Trowell OA & Westgarth DR (1959). A method for differential cell counting in certain organs. *Anatomical Record* 134: 463–471.
- Vaughan DK & Lasater EM (1990). Glial and neuronal markers in bass retinal horizontal and Müller cells. *Brain Research* 537: 131–140.
- Wässle H (2004). Parallel processing in the mammalian retina. *Nature Reviews Neuroscience* 5: 747–757.
- Wagner HJ (1972). Vergleichende Untersuchungen über das Muster der Sehzellen und Horizontalen in der Teleostierretina (Pisces). *Zeitschrift für Morphologie der Tiere* 72: 77–130.
- Zueva LV (1980). Retinal cones of the black sea anchovy *Engraulis encrasicolus* – an analyzer of polarized light in vertebrates. *Zhurnal Evolyutsionni Biokimii i Fiziologii* 17: 602–605 (englische Übersetzung in: *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 17: 420–425).

3.2 3D-topography of cell nuclei in a vertebrate retina – A confocal and two-photon microscopic study

Petra C. Koch, Christian Seebacher, Martin Heß



Publiziert als:

Koch PC, Seebacher C & Heß M (2010). 3D-topography of cell nuclei in a vertebrate retina – A confocal and two-photon microscopic study.

Journal of Neuroscience Methods 188: 127–140.



3D-topography of cell nuclei in a vertebrate retina—A confocal and two-photon microscopic study

Petra Christiane Koch^a, Christian Seebacher^b, Martin Heß^{a,*}

^a Biozentrum LMU München, Biology 1, Großhadernerstr. 2, 82152 Planegg-Martinsried, Germany

^b Bio Imaging Zentrum, Großhadernerstr. 2, 82152 Planegg-Martinsried, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 January 2010

Accepted 23 January 2010

Keywords:

Anchovy
Area centralis
Acute vision
Cell pattern
Convergence
Fish eye
Polarization vision

ABSTRACT

We demonstrate methods to simultaneously acquire and evaluate the pattern of cell nuclei in the three cell layers of the vertebrate retina as an aspect of its functional morphology. 3D-position, shape and quantity of fluorescence-labelled cell nuclei are measured using laser scanning microscopy at several retinal locations, the pros and cons of single and two-photon excitation are compared. Subsequently topographies of all discriminable morphotypes are calculated via linear interpolation of local countings. In addition derived maps are calculated correlating density- and layer thickness-distributions to demonstrate the potential of 3D-morphometry in the retina. In the European anchovy *Engraulis encrasicolus* L. (Engraulidae, Teleostei) the angular density of all involved cell types varies considerably with the location in the hemispherical coordinate system. All cells belonging to the photopic system show a density peak in the ventro-temporal quadrant, suggesting acute vision in the frontal binocular visual field. A second, less pronounced maximum is found nasally.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The vertebrate retina is a combined two-dimensional light sensor and imaging computer with several parallel detection channels and signalling pathways, transducing electromagnetic irradiation patterns from the environment into filtered neuroelectric excitation patterns within the animals' central nervous system. Retinal functions like acuity, sensitivity or contrast mechanisms rest on geometrically well ordered structures, a principle that legitimates functional morphology as one practicable way to learn about animal vision (see e.g. Ali, 1975; Lythgoe, 1979; Archer et al., 1999). Besides histology and fine-structure this is also true for the analysis of the three-dimensional arrangement of retinal cell nuclei. Whereas single cell somata hardly can be circumscribed due to tight packing, and dendrites as well as axonal terminals cannot be assigned to their cells in the cable mess of the plexiform layers without sophisticated staining techniques, the cell nuclei are neatly separated in the retina and easily analyzable with light

microscopic resolution. Radially (i.e. normal to the retinal surface) they are sorted in three distinct nuclear layers (outer and inner nuclear layer, layer of G-cell nuclei) divided by two plexiform layers (Borwein, 1981; Dowling, 1987). Within a single nuclear layer they are separated from their neighbours by interspaces containing somatic cytoplasm and to some degree they are classifiable according to position, size, shape and internal structure. Thus the cell nuclei can be drawn on as proxies for the cells to analyze their sterical arrangement, the local densities and ratios of different cell types and their global density (and ratio) distributions.

Most studies dealing with the acquisition, analysis and interpretation of cell densities and/or density distributions (topography) of the vertebrate retina concentrate on cell types near the vitreal or scleral surface of retinal wholemounts. *Ganglion cell* distribution is generally determined by Nissl-staining (for teleosts see e.g. Collin and Pettigrew, 1988a,c; Cook and Becker, 1991; Douglas et al., 2002) and/or retrograde labelling via the optic nerve. Fluorescence labelling of G-cells is reported only in few topographic studies yet (teleosts: Douglas et al., 2002; pig: Garcia et al., 2005; human: Sjöstrand et al., 1994). *Cone photoreceptor* density was either investigated using wholemounts on the basis of DIC (human: Curcio et al., 1987; elasmobranchs: Litherland and Collin, 2008) or IHC (e.g. Kryger et al., 1998; Schivitz et al., 2008 for higher vertebrates) or using conventionally stained tangential sections (for teleosts see e.g.: O'Connell, 1963; Beaudet et al., 1997; Reckel et al., 2001; Miyazaki et al., 2002; Heß, 2009). Determination of *rod photoreceptor* densities is a difficult venture and can be achieved via counting nuclei (Zaunreiter et al., 1991) or inner segments in case of rod

Abbreviations: A, amacrine cell; B, bipolar cell; C, cone photoreceptor; CLSM, confocal laser scanning microscopy; DIC, differential interference contrast; G, ganglion cell; GL, ganglion cell layer; H, horizontal cell; IHC, immunohistochemistry; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; IR, infra-red; ONL, outer nuclear layer; PE, pigment epithelium; R, rod photoreceptor; SNR, signal-to-noise-ratio; 2PM, two-photon microscopy.

* Corresponding author. Tel.: +49 171 8159275.

E-mail addresses: hess@zi.biologie.uni-muenchen.de, hess@bio.lmu.de (M. Heß).

monolayers (Steinberg et al., 1973; Andrade da Costa and Hokoç, 2000; Litherland and Collin, 2008). The topographic distribution of rods has been demonstrated in few studies by mapping (e.g. Curcio et al., 1990; Chandler et al., 1999; Zhang et al., 2004) or by transects (Østerberg, 1935; Calderone et al., 2003). Despite the importance of *second order neurons* as determinants of visual performance only few quantitative and/or topographic studies on horizontal, bipolar and amacrine cells have been realized (e.g. O'Connell, 1963; Euler and Wässle, 1995; Wässle et al., 2000; Zhang et al., 2004).

To meet the 3D nature of the retina and to largely utilize the information potential of its complex nuclear pattern we looked for a resource-saving method to simultaneously record all cell types of a retinal fragment (within the microscopic field-of-view) and to get an overall picture of differentiated cell topographies and correlations by interpolation maps from multiple local measurements. Methodical difficulties arise from (1) the great imaging depth required for wholemounts or (2) alternatively the great effort for radial sectioning, (3) the dense packing of cell nuclei especially in the ONL, (4) the partially uncertain morphological classification of INL and GL-nuclei and (5) the dimension gap between nuclear size (defining resolution) and retinal size (defining tissue area/volume required to be investigated).

For the 3D-investigation of nuclear patterns in appropriate resolution it appears favourable to use optical sectioning microscopy of fluorescence-labelled nuclei in combination with computer aided evaluation of digital 3D-image data. The following advantages are obvious: (1) cell nuclei are easily accessible to morphometric studies, because they can be stained quantitatively and with a brilliant signal-to-noise-ratio via specific fluorescent dyes. (2) Optical sectioning microscopy is widely accessible for the acquisition of 3D-data and provides well aligned image stacks of relatively thick retinal fragments with a well-defined voxel size and small out-of-focus-blur required for three-dimensional counting of nuclei. (3) Software for the display and analysis of 3D-fluorescence-data is easily available or easy to programme.

In the phase of method optimization it is essential to find advantageous combinations of (1) the imaging principle (confocal or two-photon microscopy), (2) spectrally appropriate fluorescence dyes, (3) low-effort preparations methods (wholemount or slices), (4) the dimensions of the scanning window and (5) the density of measuring sites across the retina. In a first step the procedure should provide a set of digital 3D-data stacks containing nuclear images of all three layers with good signal-to-noise-ratio, in a resolution that allows the clear separation of densely packed rod nuclei and some classification of INL nuclei, with retinal coordinates as precise as possible and optimized for correct acquisition of topographic gradients with minimal total data volume. In a second step the display and evaluation of raw-data (3D arrays of grayscale values) and meta-data (nuclear positions, shapes, countings, maps) has to be effected that in addition opens up new possibilities for correlative analysis.

In this study, the methods were tested and adapted to the spatial dimensions and to the resolution required for the retina of the European anchovy *Engraulis encrasicolus*. This teleost species was chosen due to its extraordinary outer retinal structure characterized by an unusual fine-structure and arrangement of cone photoreceptors enabling polarization contrast vision (O'Connell, 1963; Fineran et al., 1976; Novales-Flamarique and Harosi, 2002; Heß et al., 2002, 2006). About 90% of the retinal area contains two cone types (long and short cones) alternately lined up in long chains ("polycones") with their outer segment lamellae arranged radially and orthogonally between neighbours. Another peculiarity is the fact that the anchovy's pigment epithelium is strongly geared with the neuroretina and cannot be detached without causing damage, thus DIC techniques cannot be applied for cell countings. Based on the nuclear distribution patterns obtained here, conclusions can be

drawn about the visual field, some visual capabilities and neuronal wiring of European anchovies.

2. Materials and methods

2.1. Animals and fixation

Animals (European anchovy, *E. encrasicolus* (Linnaeus, 1758)) of about 12 cm standard length were obtained from fishermen (Rovinj, Croatia, North-Adriatic) arriving in the dawn two hours after taking their nocturnal catch aboard. The eyes (diameter about 7 mm) were enucleated from the head immediately, cornea, lens and vitreous removed and the remaining eye cups immersed in 4% formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) and stored at 4 °C for several days.

2.2. Tissue preparation and fluorescence labelling

For fluorescence microscopy flat retina *wholemounts* were prepared by washing the eye cups in phosphate buffer, removing the sclera and cutting a number of incisions in the peripheral retina normal to the margin (Figs. 2A and 3A). The tissue was mounted on glass slides, G-cell layer up, cell nuclei stained with To-Pro-3 (molecular probes, 1:500) or DAPI (molecular probes, 1:1000) for several hours in the dark at room temperature, washed with buffer, embedded in anti-fading reagent (VectaShield, Vector Laboratories) and sealed under a cover slip with nail polish. To avoid squeezing, the cover slips were not applied directly onto the tissue, but spaced about 450 µm from the glass slide by stacks of 3 cover slip fragments on each side. The same stains were applied to *vibratome sections*: after embedding retinal fragments in 4% agarose, 75 µm sections were cut with a Leica VT1000S vibratome radially (i.e. planes normal to the retinal surface). Vibratome sections were mounted between glass slides and cover slips without spacers.

2.3. Confocal microscopy

In a first step a contiguous area of about 1250 µm × 2000 µm of the G-cell layer was scanned in the ventro-temporal quadrant of a DAPI-stained retinal wholemount (Fig. 1C). For this purpose slightly overlapping stacks (256 µm × 256 µm, pixel-size 0.5 µm, optical slice spacing 1.0 µm) were acquired with an upright confocal microscope (Leica SP5 AOBS) using a Leica HCX APO L U-V-I 40x long distance water dipping objective (NA=0.8) and the 405 nm diode laser line. Brightest point projections (XY plane, Fig. 1A) of each stack were stitched horizontally to get a single widefield fluorescence picture of the G-cell layer near the area ventro-temporalis. Subsequently every nucleus (except some elongate nuclei, most likely from endothelial cells) in a rectangular field of 1330 µm × 1030 µm was tagged manually in Photoshop with a circular black dot to get clear and uniform abstractions (Fig. 1B) for the following automatic counting and mapping in IDL (Interactive Data Language 7.0, Research Systems, Inc.). The number of cell nuclei was calculated in any chosen area by dividing the total number of black pixels by the area of a single dot (69 pixels). To get a clue about an appropriate counting window size for a smooth and still correct display of cell-density gradients, square areas of 50, 70.7 and 100 µm edge length (2500, 5000 and 10000 µm²) were tested in different ways: with the help of simple self-programmed IDL algorithms 1D-line profiles (Fig. 1D) and 2D-contour maps (Fig. 1E–J) were generated. The cell-density topography of the testing area was displayed either using "gliding" counting windows centred at every pixel of Fig. 1B subsequently (Fig. 1H), or by interpolating the density values of fixed neighbouring squares covering the testing area completely (Fig. 1E–G) or partially (Fig. 1I and J).

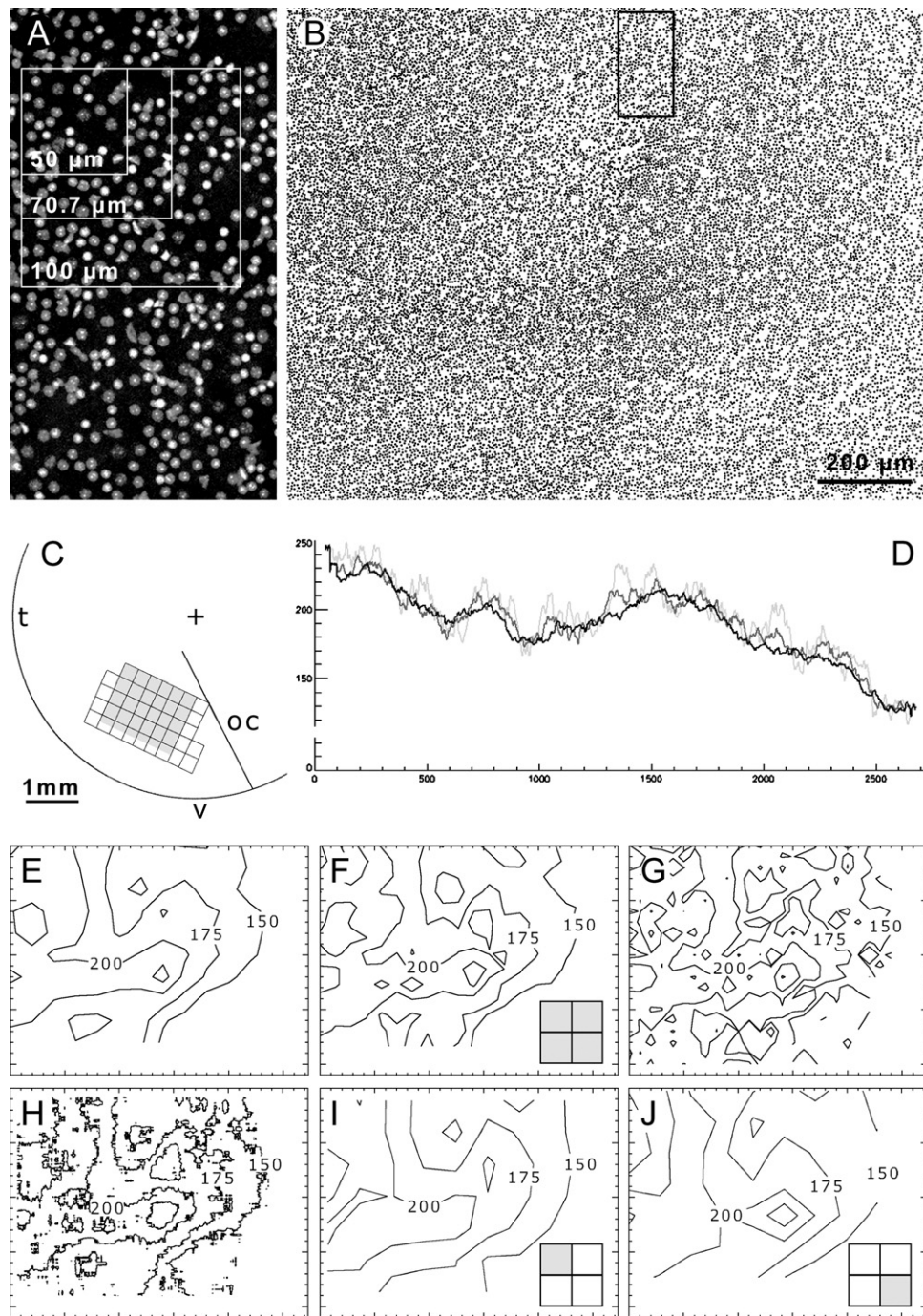


Fig. 1. 2D-mapping of cell nuclei (CLSM). (A) Clip of a confocal stack (brightest point projection) of DAPI-stained cell nuclei in the ganglion cell layer of the European anchovy. For mapping experiments all nuclei were counted except those with elongate profiles (►) within measuring squares of 50, 70.7 and 100 μm edge length. (B) Test area for mapping experiments (1.42 mm^2 , gray area in C). Every black dot indicates a single manually marked cell nucleus (total of 25060 nuclei), the rectangle indicates an area as big as A. (C) Position of the test area (gray rectangle) in the ventro-temporal quadrant of the retina (right eye). The black grid indicates the field of overlapping confocal stacks recorded. oc: optical cleft, t: temporal, v: ventral, +: retinal centre. (D) Line profiles of continuous cell counts (nuclei per $10^4 \mu\text{m}^2$) along the mid-horizontal line in B using measuring squares of 100 μm (black line), 70.7 μm (dark grey line) and 50 μm edge length (light grey line). (E) Density map (counts per $10^4 \mu\text{m}^2$) using all neighbouring 100 $\mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ squares. (F) Density map using all neighbouring 70.7 $\mu\text{m} \times 70.7 \mu\text{m}$ squares. (G) Density map using all neighbouring 50 $\mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ squares. (H) Density map using continuously shifting 100 $\mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ squares. (I) Density map using 70.7 $\mu\text{m} \times 70.7 \mu\text{m}$ squares, omitting every second square in x- and y-direction. (J) Same as I, but shifted one square in x- and y-direction.

In a second experiment To-Pro-3 stained retina wholemounts were investigated in 3D with the Leica SP5 using the 633 nm HeNe laser line. The far-red emitting fluorescence dye was chosen to get maximum tissue transparency for excitation and imaging within nervous tissue as deep as 250 μm . Again the field-of-view for a single 3D-stack was adjusted to 256 $\mu\text{m} \times 256 \mu\text{m}$ (512 \times 512 pixels) to image cell nuclei at 0.5 μm XY-resolution (Z-spacing 1.0 μm)

to get enough details to distinguish nuclear staining patterns on the one hand and to get enough cells per sample to level out local cell-density fluctuations on the other hand. 3D-stacks were taken from the G-cell layer down to the outer nuclear layer at 29 positions across the retina spaced about 1.5 mm, in the ventro-temporal quadrant the scanning sites were set more densely (Fig. 2A). To get the exact location of each stack the outline of the wholemount

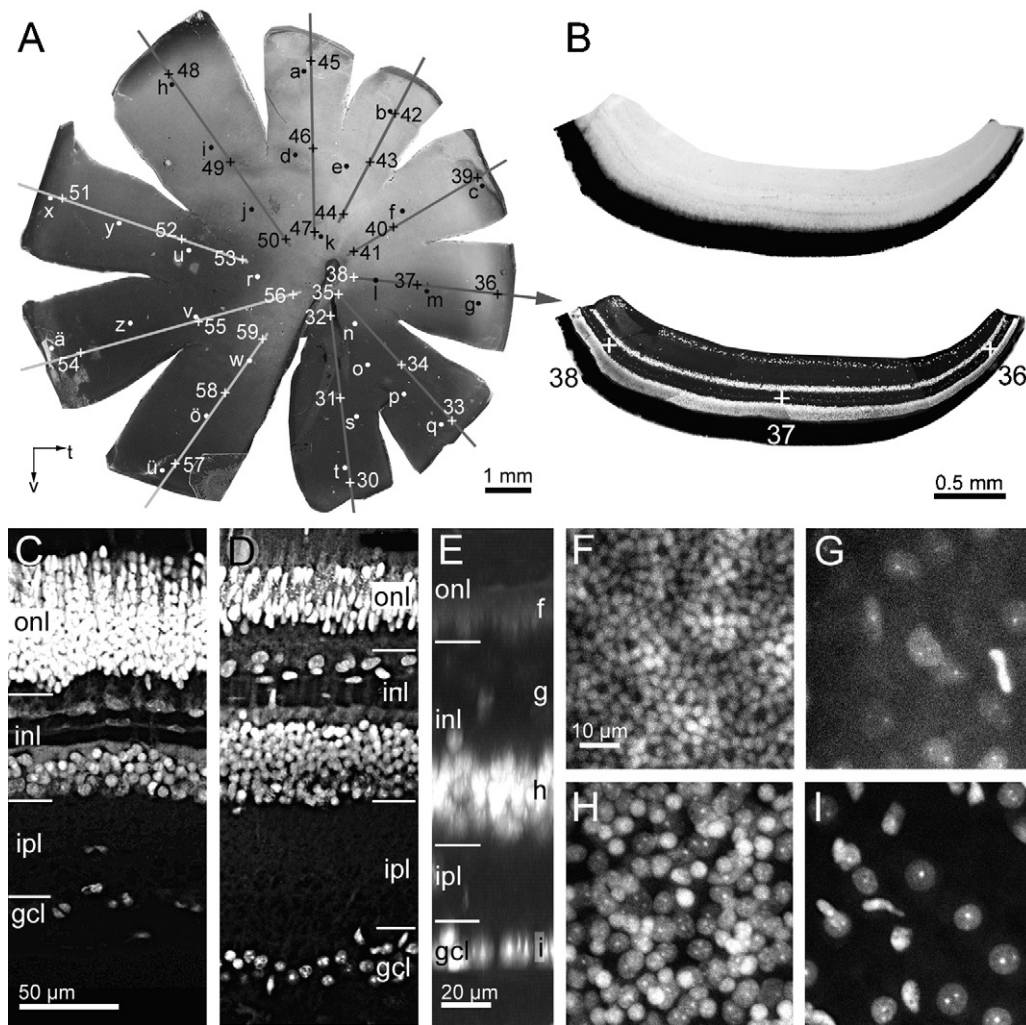


Fig. 2. 3D-mapping of cell nuclei (CLSM). (A) Wholemount of left anchovy retina prepared for CLSM (ganglion cell layer up); dots: 29 sampling sites for the determination of ganglion cell density, crosses: 30 sampling sites for the determination of horizontal cell density and layer thickness (on radial sections along the grey lines). (B) Radial vibratome section of anchovy retina (50 μm , top: brightfield, bottom: To-Pro-3 fluorescence, +: three sampling sites as in A). (C) Brightest point projection of a CLSM stack (50 μm radial section, To-Pro-3 staining, sampling site 58). The ventral retina is characterized by high rod density and low density of cones, second and third order neurons. (D) Brightest point projection of a CLSM stack (50 μm radial section, To-Pro-3 staining, sampling site 36). The temporal retina is characterized by low rod density and high density of cones, second and third order neurons. Same magnification as in C. (E) Brightest point projection of a CLSM stack (wholemount, To-Pro-3 staining, sampling site 55), digitally resliced normal to the imaging planes. Note decreasing signal-to-noise-ratio with increasing imaging depth (starting at ganglion cell layer, compare with Fig. 3B). (F–I) Indicate the scanning levels of Fig. 1F–I). CLSM scans (brightest point projections of selected subvolumes) at different depths of a To-Pro-3 stained retinal wholemount. Signal-to-noise-ratio notice decreases with imaging depth z (see Fig. 1E). Bar in F applies to all. (F) Rod nuclei at the vitreal border of the ONL, $z = 148 \mu\text{m}$. (G) Horizontal cell layer, $\Delta z = 115\text{--}130 \mu\text{m}$. (H) Bipolar and amacrine cell layer, $\Delta z = 65\text{--}100 \mu\text{m}$. (I) Ganglion cell layer, $\Delta z = 0\text{--}20 \mu\text{m}$. gcl: ganglion cell layer, inl: inner nuclear layer, ipl: inner plexiform layer, onl: outer nuclear layer, v: ventral, t: temporal.

was tracked to a Cartesian coordinate system using the digital XY-position display of the microscope stage and plotting the XY-centre-coordinates of each stack into the same coordinate system.

In a third step the wholemount was removed from the glass slide, cut into ten pieces following the existing radial incisures to the retinal centre and each piece was embedded in 4% agarose for vibratome sectioning (radial 50 μm slices through the central plane of each piece, i.e. along the straight lines in Fig. 2A). This thickness turned out to be the upper limit for a thorough infiltration of the ONL with To-Pro-3 and for a reasonable imaging resolution near the glass slide. The ten central slices were stained again with To-Pro-3, embedded in VectaShield, and cover-slipped. Each slice was scanned at three locations (inner, middle and outer portion, see e.g. Fig. 2B) with the same settings as described above and the centre-coordinates of each stack was plotted in the coordinate system of the wholemount (altogether 30 locations, note: the Y-coordinate of the radial scan = Z-coordinate in the tangentially oriented wholemount, compare e.g. Fig. 2D and E).

2.4. Two-photon microscopy

As an alternative to confocal optical sectioning 3D-stacks of DAPI-stained retinal wholemounts were sampled with non-linear optics. The imaging system used for this study was an inverted light microscope (iMic-prototype, TILL-Photonics/Agilent-Technologies) equipped with a pulsed infrared laser (Mai-Tai, Spectra Physics, 730 nm, 80 MHz). Prior to 3D-scanning an 2D overview picture of an entire wholemount was composed from a mosaic of 6 by 7 epifluorescence frames focussed on the inner retinal surface (Olympus 4 \times objective, NA=0.1, Fig. 3A). 34 scanning sites were defined in the Cartesian coordinate system across the wholemount, spaced from each other about 0.5–1.5 mm with increased density in the ventro-temporal quadrant of the retina (Fig. 3A). Scanning was performed at each site with an Olympus 60 \times water immersion objective (NA=1.2), or an Olympus 60 \times air long distance objective (NA=0.9) if the maximal imaging depth exceeded the working-distance of the former objective.

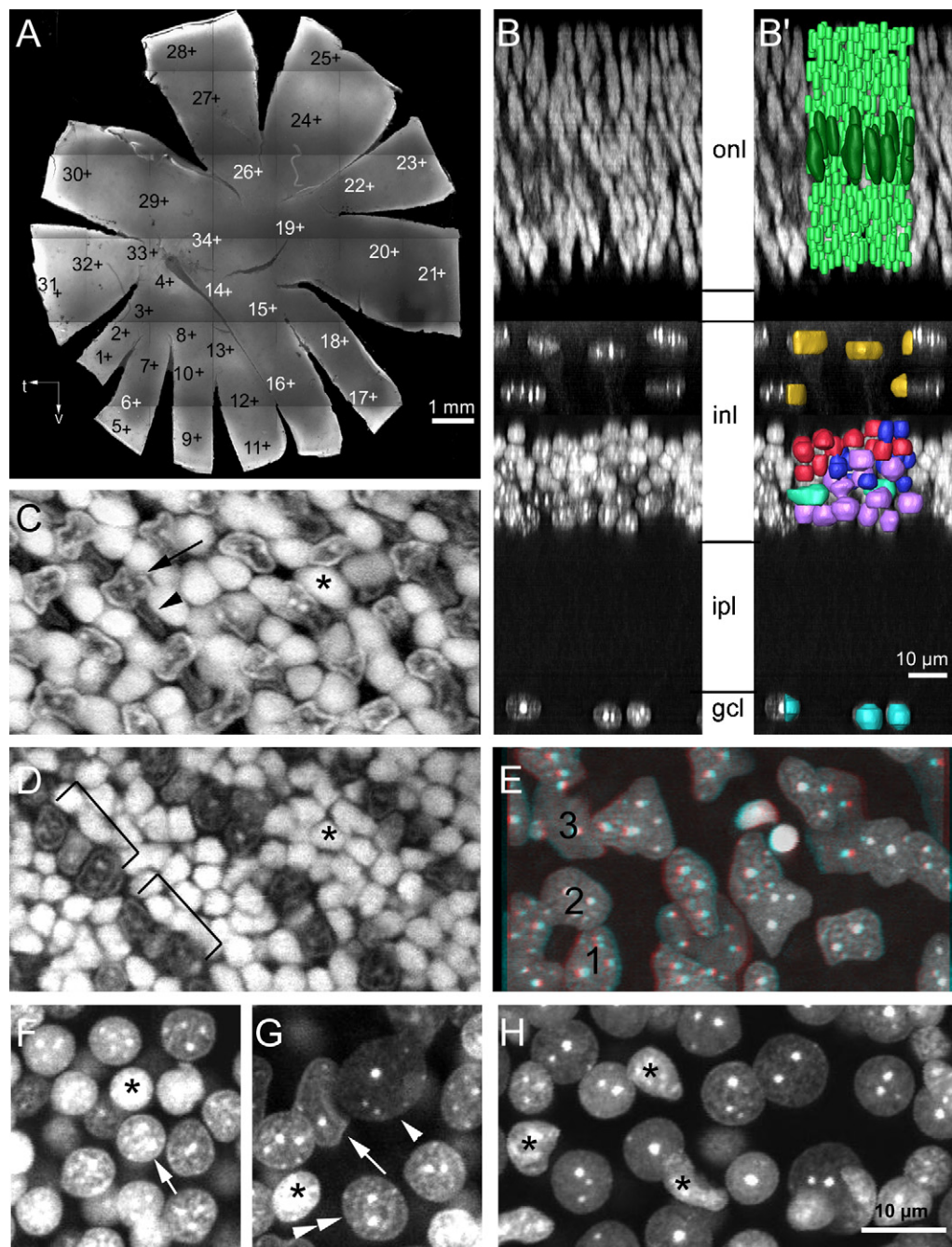


Fig. 3. 3D-mapping of cell nuclei (2-photon-microscopy). (A) Wholemount of right anchovy retina prepared for 2-photon-microscopy (ganglion cell layer up, montage of 42 neighbouring scans) with 34 sampling sites for the determination of cell densities (crosses). (B) Brightest point projection of a 2-photon stack (wholemount, DAPI staining) digitally resliced normal to the imaging planes. Note good signal-to-noise-ratio even in great imaging depths (i.e. onl, compare with Fig. 2E). (B') Same as B with cell nuclei reconstructed for individual counting (Amira®). (C–H) Two-photon scans of DAPI-stained cell nuclei of a retinal wholemount, brightest point projections of small retinal subvolumes. Bar in H applies to all. (C) Polycone-pattern in the area centralis at the level of short (arrowhead) and long (arrow) cone nuclei with rod nuclei (asterisk) in between. (D) Rows of triple cones in the dorsal periphery of the retina at nuclear level (brackets) with masses of rod nuclei (asterisk) in between. (E) Horizontal cell nuclei type 1–3. In this 3D-anaglyphe seen from vitreal H1 nuclei appear on top, H3 nuclei most distant (use red-green-glasses; left eye: red, right eye: green). (F) Nuclei in the scleral portion of the inner nuclear layer. asterisk: small, bright B-cell nucleus type 1, arrow: bigger, granulated B-cell nucleus type 2. (G) Nuclei in the vitreal portion of the inner nuclear layer. Asterisk: small, bright B-cell nucleus type 1, double arrowhead: granulated second order neuron nucleus type 3 (amacrine cell), arrow: elongate, transparent second order neuron nucleus type 4, arrowhead: large, transparent second order neuron nucleus type 5. (H) Nuclei of the ganglion cell layer; irregularly shaped nuclei (asterisks) may belong to glia cells. gcl: ganglion cell layer, inl: inner nuclear layer, ipl: inner plexiform layer, onl: outer nuclear layer, v: ventral, t: temporal.

The scanning window had 400 by 400 px and 250–300 stacked images were taken from inner to outer “limiting membrane”. Voxel size was adjusted to $150 \text{ nm} \times 150 \text{ nm} \times 750 \text{ nm}$ considering a correction factor for Δz of 0.92 due to the different refraction indices of immersion water ($n=1.33$) and VectaShield ($n=1.44$). Bidirectional scanning with about $30 \mu\text{s}/\text{pixel}$ was used and laser intensity was increased with depth exponentially (0.37% from

image to image). The experiment was repeated for a second ventro-temporal retinal quadrant.

2.5. Counting of cell nuclei and measurement of layer thicknesses

Cell densities per unit area were determined in each 3D-fluorescence stack as follows: The stacks were imported into

Table 1
CLSM data drawn from a To-Pro-3 stained wholemount.

Sampling site in Fig. 2A	Ganglion cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$	Sampling in Fig. 2A	Ganglion cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$	Sampling in Fig. 2A	Ganglion cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$
A	34	k	62	u	51
B	33	l	99	v	51
C	32	m	95	w	50
D	39	n	145	x	60
E	36	o	140	y	48
F	54	p	162	z	35
G	61	q	88	ā	30
H	44	r	63	ō	39
I	48	s	119	ü	50
J	57	t	85		

Amira® software (Template Graphics Software Inc., Version 4.1) and voxel size adjusted correctly. Rectangular counting windows were defined (e.g. $30 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$) parallel to the nuclear layers in tangentially “cut” optical section series and normal to the layers in radially sectioned stacks. Every single nucleus that was situated more than 50% within the borders of the counting volume was labelled manually on every plane it appeared and colour coded according to the respective cell type. After 3D rendering the nuclei were counted and values were converted to cells per $10^4 \mu\text{m}^2$. All values drawn from cell counts are summarized in Tables 1–3. Classification of different cell types was accomplished by the evaluation of radial position, size, shape and staining pattern of the nuclei. Building up the outer nuclear layer, cone and rod nuclei could be distinguished easily due to their size, shape and structure (Fig. 3C and D). This is also true for the three types of horizontal cells (H1–3), whose appearance is distinctive (Figs. 2G, 3B and 3E) at least in the ventro-temporal quadrant of the retina. The differentiation of secondary neurons via their nuclei was more difficult and sometimes less clear—five types of secondary neurons were classified morphologically by subjective estimation (see Fig. 3B, F and G). Within the G-cell layer the irregularly shaped nuclei are expected to belong to glia cells (Collin, 1989) and were not counted (Fig. 3H). However, all spherical nuclei in this layer, independent of size, were

labelled as G-cells, although some of them possibly represent displaced A-cells. Thus, the densities we have calculated represent upper limits.

The thickness of the IPL was directly measured as the distance between the vitreal border of the INL and the scleral border of the layer of G-cell nuclei, based on brightest point projections of 3D-stacks in perfect radial view (adjusted in Amira®) and averaged over 3–4 measurements within one image stack. Accordingly the thickness of ONL and INL was determined.

2.6. Topographic and correlative mapping

For topographic mapping (Fig. 4) the polar coordinates (r, ϕ) of each sampling site based on the wholemounts were determined graphically. Isodensity maps (cell nuclei) and isometric contour maps (layer thicknesses) were generated with IDL 7.0 (Interactive Data Language, ITT Corp.) by bi-cubic spline interpolation between the values of each sampling site. The maps were smoothed manually, scanned again and matched to photographs of the wholemounts (Photoshop 6.0). To illustrate the ratios of cell types and other arithmetic correlations, contour maps of correlative values were generated (Fig. 5) using self-programmed IDL algorithms.

Table 2
CLSM data drawn from radial sections.

Sampling site in Fig. 2A	Horizontal cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$	Thickness ONL [μm]	Thickness INL [μm]	Thickness INL [μm] without H	Thickness IPL [μm]
30	103	48	58	34	50
31	114	41	64	35	56
32	73	56	62	31	52
33	120	35	67	39	50
34	136	32	77	49	59
35	107	49	75	40	70
36	95	29	74	41	70
37	70	47	59	28	61
38	63	59	68	28	64
39	48	53	46	19	29
40	36	65	48	15	40
41	43	62	52	17	46
42	36	59	46	18	28
43	32	59	43	15	32
44	30	61	41	15	28
45	–	40	39	18	31
46	–	57	42	14	34
47	–	61	46	14	45
48	–	53	48	21	39
49	–	56	46	17	35
50	–	59	59	15	39
51	–	49	45	21	37
52	18	51	39	16	37
53	20	55	45	17	36
54	40	54	39	21	31
55	17	57	41	18	33
56	23	59	42	17	44
57	43	58	44	22	47
58	31	65	45	18	47
59	–	61	47	18	48

Table 3
Two-photon data drawn from a DAPI-stained wholemount.

Sampling site in Fig. 3A	Cones/ $10^4 \mu\text{m}^2$	Rods/ $10^4 \mu\text{m}^2$	Horizontal cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$	Bipolar type 1/ $10^4 \mu\text{m}^2$	Bipolar type 2/ $10^4 \mu\text{m}^2$	Second order neuron type 3	Second order neuron type 4	Second order neuron type 5	Ganglion cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$	Thickness ONL [μm]	Thickness INL [μm]	Thickness [μm] without H	Thickness IPL [μm]
1	385	873	108	1204	0	355	66	18	150	43.2	67.3	37.6	71
2	354	1714	111	1392	0	401	128	18	106	41.7	70.6	42.4	55
3	334	2382	78	984	0	343	67	18	108	45.2	63.0	33.4	51
4	325	5035	56	564	0	145	73	24	100	64.6	42.6	22.9	33
5	312	2179	92	1018	0	148	417	6	69	33.8	61.8	38.9	81
6	538	993	150	1761	0	212	414	<5	122	38.1	79.6	49.1	69
7	431	1190	139	1542	0	401	99	12	147	36.6	70.8	42.1	69
8	374	1831	108	1128	0	354	68	12	92	45.3	61.4	37.9	51
9	480	1882	122	1364	0	520	98	6	64	45.3	69.1	41.6	81
10	378	1483	128	1433	0	432	93	6	106	42.0	67.4	40.8	60
11	371	1197	111	956	0	430	116	12	61	42.5	57.1	39.1	70
12	347	2820	103	1110	0	348	60	24	69	53.2	63.3	36.7	62
13	373	3315	94	1009	0	314	55	6	69	53.1	58.8	34.4	50
14	110	5658	39	243	36	213	6	6	39	63.4	40.0	21.2	32
15	109	5550	34	145	72	199	6	18	14	62.9	43.0	21.1	49
16	178	5568	41	95	244	208	42	18	14	61.8	49.2	26.1	50
17	136	3631	41	183	116	127	43	37	33	41.2	46.2	23.8	39
18	122	5047	33	120	60	252	24	30	19	56.7	43.7	20.9	50
19	135	4257	25	186	84	144	18	18	28	54.2	47.5	21.0	59
20	179	3724	39	185	84	197	24	18	22	42.8	41.3	20.8	38
21	189	3396	39	114	174	287	48	24	25	36.3	52.4	26.4	47
22	150	4391	42	266	145	121	36	18	28	58.6	53.8	23.4	66
23	259	2558	50	360	85	262	55	30	42	34.8	51.1	28.8	67
24	151	4582	34	108	143	161	36	12	19	63.0	46.2	21.8	42
25	179	3475	47	121	290	103	48	12	22	44.7	51.2	24.9	55
26	123	5109	31	126	90	120	24	30	28	64.3	53.4	23.0	50
27	155	4528	25	60	66	178	0	36	17	64.1	39.4	15.6	29
28	110	4931	36	145	163	97	42	18	14	62.0	55.5	25.3	54
29	122	5865	22	54	103	109	6	18	28	67.9	49.0	18.1	46
30	149	5883	37	72	109	151	18	24	25	68.8	52.3	24.1	50
31	251	3534	39	378	43	226	55	6	33	52.9	54.8	25.8	63
32	248	5523	44	310	158	177	30	6	25	69.9	55.5	26.0	50
33	282	6196	45	143	167	149	24	6	72	80.5	45.5	24.5	34
34	151	4973	33	193	0	127	24	18	44	64.4	49.0	19.5	47

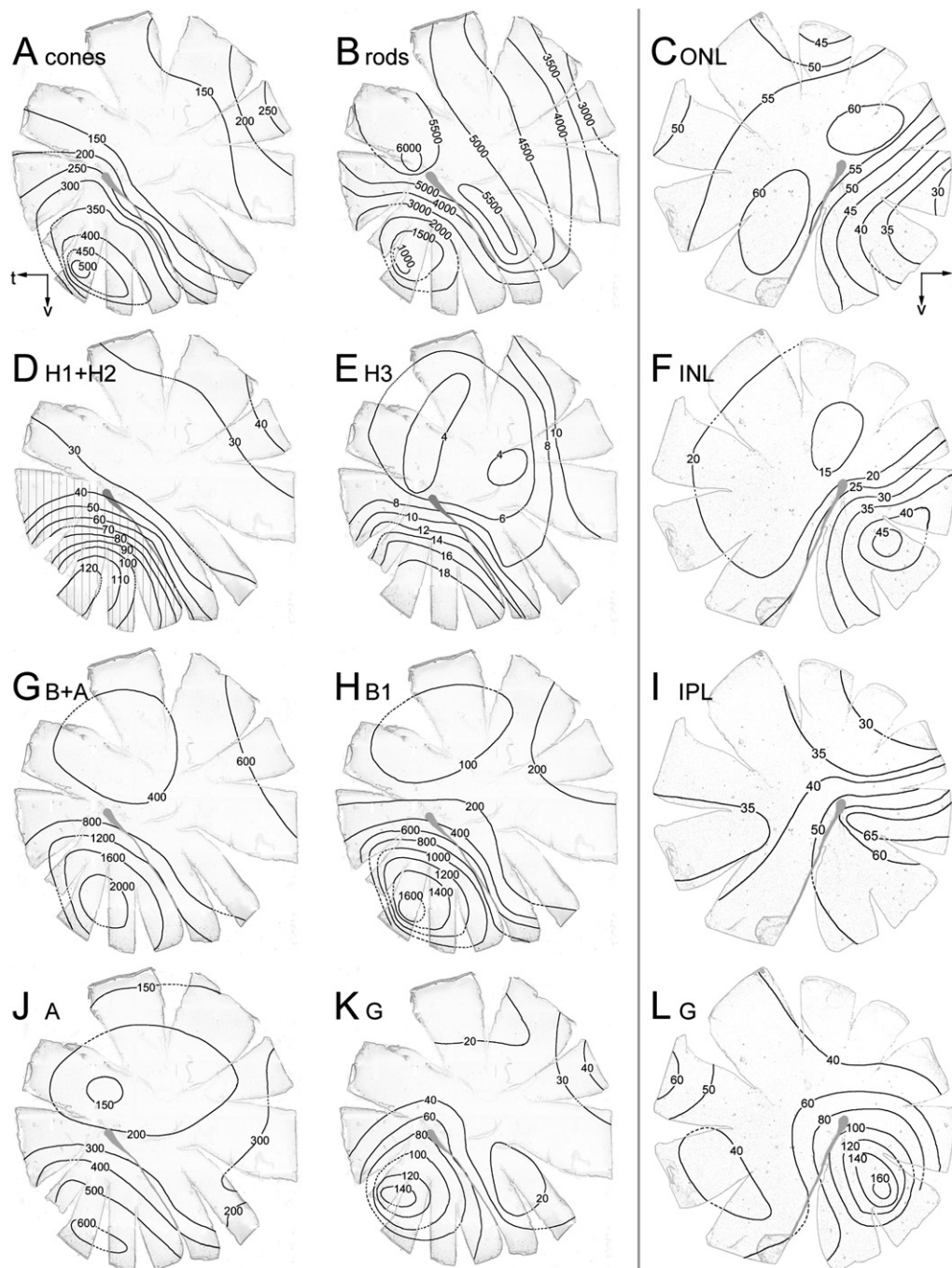


Fig. 4. Topographic mapping of cell density and layer thickness. Isodensity (cells per $10^4 \mu\text{m}^2$) and isometric (μm) contour maps illustrating the topography of different retinal cell types and the thickness of retinal sublayers, matched with original wholemounts. *Left and middle column:* values drawn from a DAPI-stained wholemount (right retina) scanned with a two-photon microscope at 34 locations as plotted in Fig. 3A. *Right column:* values drawn from a To-Pro-3 stained wholemount and radial $50 \mu\text{m}$ sections (left retina) scanned with a CLSM at 30/29 locations as plotted in Fig. 2A. t: temporal, v: ventral. (A) Cone topography. (B) Rod topography. (C) Thickness of the outer nuclear layer. (D) Horizontal cell (H1+2) topography follows substantially that of cones (see A); in the hatched region three distinct layers of horizontal cell nuclei are found. (E) Topography of H3-cells. (F) Thickness of the inner nuclear layer without horizontal cells; the INL thickness follows the density distribution of second order neurons (see figure (G)). (G) Topography of B- plus A-cells. (H) Topography of B-cells type 1 follows that of second order neurons (G), but with steeper gradients. (I) Thickness of the inner plexiform layer. (J) Topography of putative A-cells (second order neuron nuclei types 3–5). (K) Topography of ganglion cells (derived from 2-photon microscopy). (L) Topography of ganglion cells (derived from confocal microscopy) is very similar to that drawn from 2-photon-scans (see figure (K)).

3. Results

3.1. Methods

Initially the resolution that is necessary to count (e.g. Figs. 1A and 3B') and classify (Fig. 3C–H) cell nuclei in all layers in a uniform manner had to be determined. This was tested with CLSM on wholemounts and radial vibratome sections of the

retina and it always caused good results at a pixel-size of max. $0.5 \mu\text{m} \times 0.5 \mu\text{m}$, both with blue (DAPI) and red (To-Pro-3) emitting fluorescence dyes. The diameters of cell nuclei in the anchovy retina lie between $11 \mu\text{m}$ for some horizontal cells (Fig. 3E) and ca. $3.5 \mu\text{m}$ for rods (Fig. 3D), the distances of nuclear surfaces between nearest neighbours amount to maximally $7.5 \mu\text{m}$ for horizontal cells and to minimally ca. $0.25 \mu\text{m}$ for photoreceptors. Accordingly the default scanning area of 512×512 pixel results in a $256 \mu\text{m} \times 256 \mu\text{m}$ field-

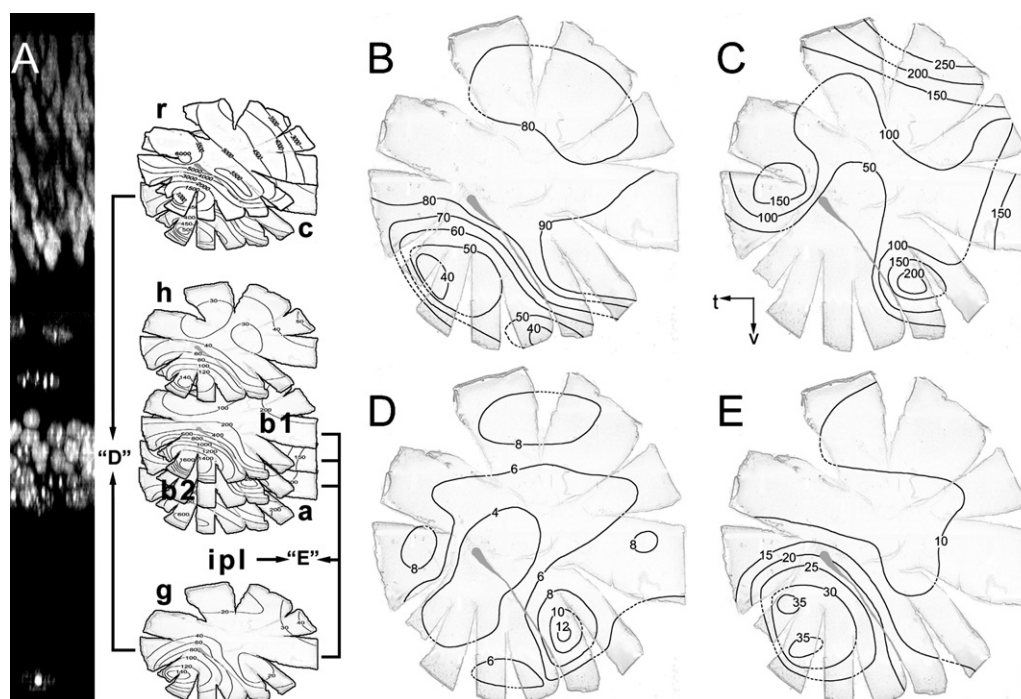


Fig. 5. Topographic correlation maps. (A) Survey of retinal layering and topography (from Figs. 3B and 4) and two examples, how maps can be correlated (see D and E). (B) ONL compactness map: $(r + c)/dONL$. (C) Subpopulation of B2 cells: $(B + A) - (B1 + A)$. (D) Estimation of photopic convergence: c/g . (E) Degree of IPL ramification: $(b1 + b2 + a + g)/dIPL$. a amacrine cell topography, b1 bipolar cell topography, b2 bipolar cell topography, c cone topography, g ganglion cell topography, h horizontal cell topography, ipl inner plexiform layer, r rod topography, t temporal, v ventral.

of-view, containing from 200 (horizontal cells) to more than 5000 (rods) nuclear profiles in a single stack of horizontal imaging planes. In radial imaging planes this field-of-view is large enough to cover all three nuclear layers in all retinal regions, even if the layers are oriented parallel to the image X-axis (Figs. 2C, 2D and 3B).

For the acquisition of 3D-stacks an “optical slice thickness” of 0.5–1.0 μm was sufficient to distinguish densely packed rod nuclei in the ONL, leading to single data volumes of max. 10.5 MB (8bit grayscale without compression). To avoid crosstalk between neighbouring planes the use of high-aperture objectives with small point-spread-functions is favourable (e.g. 63 \times water immersion, NA 1.2, z-resolution = 0.29 μm). For the comparatively fast-bleaching To-Pro-3 or if the tissue-thickness exceeds the free working-distance of the 63 \times objective (i.e. 220 μm), a 40 \times water dipping objective (NA 0.8, z-resolution = 0.82 μm , working-distance 3300 μm) was used alternatively without affecting the desired XY-resolution.

We did not succeed in acquiring evaluable stacks applying CLSM scanning on wholemounts. Due to the inseparable interdigitation of anchovy photoreceptors with the PE scanning has to start from the vitreal surface of the retina, but in an imaging depth of 110–240 μm (scleral border of the ONL) the signal-to-noise-ratio for To-Pro-3 stained photoreceptor nuclei is by far too low for clear discrimination (Fig. 2E–I). Using DAPI the maximal useful imaging depth was “only” ca. 75 μm . Therefore confocal imaging had to be performed on radial sections using To-Pro-3 and the 40 \times objective (Fig. 2B). Here we found an optimal thickness of vibratome slices around 75 μm that allowed (1) thorough and homogenous infiltration of the ONL with To-Pro-3 (ca. 1 h at room temperature), (2) good distinguishability of neighbouring photoreceptor nuclei in all imaging depths and (3) easy measurability of layer thicknesses (after digital rotation in “perfect” radial orientation, Fig. 2C and D). A trade-off of this method is the comparatively low number of H- and G-cells on an area of 256 $\mu\text{m} \times 75 \mu\text{m}$ in the nuclear planes (i.e. normal to the imaging plane).

The use of a two-photon-microscope, however, yielded excellent images of cell nuclei in all imaging depths using DAPI-stained wholemounts (Fig. 3), even in the deeply embedded ONL (Fig. 3B–D). This can be impressively demonstrated on digital XZ-reslices (equivalent to a radial section, Fig. 3B). Despite higher potential transparency for far-red light emission To-Pro-3 was not accessible for excitation with the available pulsed infrared laser. Two-photon 3D-scanning with blue emission was optimized by an exponential increase of the excitation energy with imaging depth on the microscope prototype used, voxel size was set to 0.15 $\mu\text{m} \times 0.15 \mu\text{m} \times 0.75 \mu\text{m}$ (for better separation of rod nuclei in the ONL) and the scanning window had 400 \times 400 pixels (60 $\mu\text{m} \times 60 \mu\text{m}$).

Strictly speaking an exact topographical picture of the cell nuclei distribution of an entire retina needs the registration of every single nucleus. This could be achieved via the time-consuming and data-intensive acquisition of many slightly overlapping stacks, adaptive adjustment of the z-scanning range to the unevenness of the wholemount and subsequent 3D-stitching. For the description of common retinal cell-density gradients, however, much coarser sampling is sufficient: their steepness hardly exceeds 6% of total density range per 100 μm (steepest slope of G-cell densities in Fig. 4K; rods 5.5% in Fig. 4B) and, as a rule, extrema are spaced several millimetres. The number and position of single scanning volumes was optimized on a wholemount in two steps. First about six measurements of G-cell density per retinal quadrant were recorded with more or less uniform distribution (e.g. two per wholemount-lobe), then, after generating a rough G-cell map, further measuring sites were added in regions of steeper gradients (here: area ventro-temporalis). The microscope stage coordinates of every scanning site and distinctive landmarks of the wholemount outline have to be recorded for correct mapping. Of course the mapped position of extrema is slightly shifted with respect to the exact position (except the measuring site hits the extremum exactly), here this applies especially to the rod maxi-

num that does not fall into the quadrant of increased sampling density.

In a contiguous test area covering 14% of the ventro-temporal quadrant close to the G-cell area we tested the effects of differently sized counting windows and different sampling densities (Fig. 1) on topographic mapping. The total number of tagged nuclei was about 25060, a value that may be minimally underestimated due to minimal overlap of some nuclear profiles in the brightest point projection image of the G-cell “monolayer”. In this retinal region the nuclear profiles covered about 30% of the area with a non-uniform distribution at two scales: the distances between neighbouring nuclei vary between virtually zero and 25 μm (type 1 inhomogeneity), the cell-density values varied between 125 and 225 cells per $10^4 \mu\text{m}^2$ comprising G-cells as well as an unknown portion of displaced A-cells and Glia-cells (type 2 inhomogeneity). Due to the discrete nature of structural units (i.e. nuclei of several μm in diameter) and the type 1 heterogeneity there is a lower limit for an useful counting window size to image the cell topography (i.e. type 2 heterogeneity). In the case of the G-cell layer counting windows of less than $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ turned out to produce considerable “noise” (Fig. 1D–G), this may similarly apply to the low-density H-cell layer, whereas the high-density ONL and INL can be analyzed with much smaller windows (e.g. $30 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$). Shifting the $100 \mu\text{m}$ window over the test area pixel-by-pixel also results in considerably noisy contour lines (Fig. 1H) whereas directly adjacent windows give perspicuous maps (Fig. 1E). The general topographic picture does not change much if 75% of the windows are omitted (compare Fig. 1F and I or J), but the exact course of the contour lines changes depending on the size, distance and position (compare Fig. 1I and J) of counting windows and the defined contour values.

The enumeration of cell nuclei in the raw-data stacks was done following segmentation of every single nucleus in one projection plane (G- and H-cell monolayers) or several original planes (ONL, INL) manually using Amira® (Fig. 3B). Although semiautomatic counting of cell nuclei was successfully tested for G-cells and secondary neurons (Heß, 2007) it is technically not yet mature to analyze the ONL and to classify cell nuclei in the INL and GL.

3.2. Outer nuclear layer

Using fluorescence laser scanning microscopy the outer nuclear layer appears as a compact layer of tightly packed photoreceptor cell nuclei. Its thickness varies between 29 μm in the area ventro-temporalis (CLSM, Table 2) and 81 μm in the dorso-temporal retina (2-photon, Table 3; compare e.g. Fig. 2C and D, see also Fig. 4C). In the two-photon stacks cone and rod nuclei are easily distinguishable for counting (Fig. 3C and D), even though rod nuclei are lying closely together and some adjacent cone nuclei seem to merge in slightly oblique optical sections. DAPI-stained rod nuclei are characterized by a bright homogeneous fluorescence with a mean diameter of 3–4 μm . Due to the tight package they mostly deviate from an ovoid shape and are separated from their neighbours only by very narrow cytoplasmatic spaces (Fig. 3C and D). Cone nuclei are elongated in radial alignment with an average length of 18–20 μm and a diameter of 4–5 μm . Their fluorescence is less bright than that of rod nuclei and not homogenous (bright wall plus several spot-shaped chromocenters, Fig. 3C and D). Within the ONL the cone nuclei take up central positions (Fig. 3B'), shifted slightly sclerally in areas of low rod density. Furthermore, in the bigger part of the retina, cone nuclei are arranged in a regular row pattern, following the polycone-architecture continuing scleral to the OLM, rod nuclei fill the space between these rows (Fig. 3C). The centroids of long- and short-cone nuclei are displaced radially about 10 μm (not shown). In triple cone regions the row pattern consist of reiterating groups of three cone nuclei (Fig. 3D, e.g. at sampling sites 17 and 28 in Fig. 3A). Both, the numbers of cones and rods in small

volume elements of the ONL vary considerably depending on the position in the retinal coordinate system, accordingly this applies to the thickness of the ONL (Fig. 4C) and the rod/cone ratio (Table 3). The density distributions of both photoreceptor types are shown in Fig. 4A and B (approximation of the real distribution by linear interpolation of 34 local values). A marked cone density peak (about 538 cones/ $10^4 \mu\text{m}^2$, comprising up to 35% of the photoreceptors at this site) is found in the ventro-temporal quadrant. This maximum defines a specialized “area”, which is nasally bordered by the optical cleft. This is the passage of the optic nerve and sets a line of discontinuity in all maps, the according “jump” of values, however, was avoided when drawing topographic maps (Figs. 4 and 5). From this area the cone density decreases about 3.7-fold towards the dorsal periphery and the fundus. A broad streak of low cone density is running from dorso-temporal to ventro-nasal (<150 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$) and a second less steep maximum is located at the dorso-nasal periphery (ca. 260 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$). The rods show the reverse distribution: density maxima (5500–6200 rods/ $10^4 \mu\text{m}^2$) are found in the dorso-temporal and ventro-nasal retina (here rods comprise 98% of all photoreceptors), whereas in the cone area the rod density drops down to a minimum of less than 1000 rods/ $10^4 \mu\text{m}^2$. A second decline to values below 3000/ $10^4 \mu\text{m}^2$ occurs towards the dorso-nasal periphery.

3.3. Inner nuclear layer

In *E. encrasicolus* the nuclear layer of retinal interneurons is divided into two distinct horizons when examined by 3D-fluorescence microscopy. Sclerally three types of horizontal cell nuclei (H1–3 following the nomenclature of Heß et al., 2002) form a layer clearly separated from the tightly packed nuclei of other second order neuron types by a ca. 13–15 μm thick stratum of Müller-glia-fibres (Figs. 2D and 3B). The H1- and H2-nuclei with an oval to moderately flattened shape and bright chromocenters (mean diameters 8 and 9.5 μm , respectively) are arranged farthest scleral, their centroids define two separate planes spaced up to 7.5 μm in the ventro-temporal quadrant (Figs. 2D and 3B; see also Fig. 3E), in other parts of the retina this separation is less distinct or absent (Fig. 4D) and the nuclei are larger (diameters 12–17 μm). The strongly flattened H3 nuclei (mean diameter in horizontal planes about 15 μm , radially 5 μm) are situated right in the middle of the Müller-fibre stratum. The density distribution of horizontal cells is similar to the cone topography (Fig. 4D and E) with minimal values in the dorso-temporal, central and ventro-nasal retina (H1+2: ca. 20 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$; H3: ca. 4 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$) and maxima of about 130 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$ (H1+2) and 19 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$ (H3) in the ventro-temporal quadrant, coinciding with the cone area. A second smaller maximum is located towards the dorso-nasal periphery with about 40 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$ (H1+2) and 11 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$ (H3). H1-cells outnumber H2-cells in the area ventro-temporalis with a ratio between 1.4 and 2.1, the (H1+2)/H3 ratio amounts to 2.5–7.3 depending on retinal location.

The compact layer of B-, A- (and of course some Müller-) cell nuclei, in the following designated as INL (sensu stricto), displays regional differences in its thickness (Fig. 4F). In the centre of the ventro-temporal quadrant the INL expands to almost 50 μm , it does not reach 20 μm in the central retina with a minimum in the dorso-temporal quadrant ($<15 \mu\text{m}$). The density distribution of all INL nuclei summarized follows the cone topography (Fig. 4E): density peaks at around 2300 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$ in the area ventro-temporalis and again in the dorso-nasal periphery (>600 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$). Lowest values occur in a broad streak running from the dorso-temporal (<400 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$) to ventro-nasal retina.

A morphological differentiation of INL nuclei types by position, shape, size and inner structure (DAPI signal) was attempted to roughly distinguish B-cells from A-cells and, under reserva-

tions, subpopulations of these second order neurons. The numerous small nuclei with bright homogeneous DAPI-fluorescence (diameter 4.8–5.6 μm) comprising the main part of the scleral portion of the INL were labelled as *bipolar type 1* (Fig. 3F). Slightly bigger nuclei (diameter 5.8–6.5 μm) with weaker fluorescence appearing granulated (chromocentres) were classified as *bipolar type 2* (Fig. 3F). The remainder nuclei of the vitreal portion of the INL were assigned to three classes of putative A-cells: *Second order neuron type 3* with spherical cell nuclei with several chromocentres, diameters range from about 6.5 to 8.5 μm , comprising up to 95% of the remaining cells (Fig. 3G). *Second order neuron type 4* with elongated cell nuclei and several chromocentres, comprising up to 70% of the remaining cell population in the ventro-temporal periphery, over the main expanse of the retina, however, the percentage of these cells does not exceed 20%. In regions of dense packaging the length of these nuclei reaches 8 μm , elsewhere even 12 μm (Fig. 3G). *Second order neuron type 5* with huge spherical, transparent appearing cell nuclei showing some chromocentres (Fig. 3G), occurring predominantly outside the area ventro-temporalis where rod density exceeds 4000 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$. The average nuclear diameter is about 10 μm and their proportion of putative A-cells ranges from 11% to 17%. They are surrounded by voluminous somata which are causing “plaques” at the vitreal border of the INL.

The applied classification, of course, has a subjective component and may have caused some defective assignments especially within the class of B-cell type 2, as the structural definition overlap with B-cell type 1 and second order neuron type 3. Since we could not identify Müller-cell nuclei, they are “hidden” in one or more of the 5 interneuron-classes adumbrated by nuclear morphology.

In areas of high-density B-cells type 1 account for the major component of INL thickness, the distribution follows substantially that of cones (Fig. 4H). Concentric isodensity contours surround the ventral part of the ventro-temporal area with a peak of about 1760 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$. Towards a broad streak running from dorso-ventral to ventro-nasal there is a steep density gradient to less than 100 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$. Density slightly increases in the dorso-nasal periphery (>200 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$). Due to uncertain classification a detailed analysis of the density distribution of B-cell type 2 does not appear advisable.

The topography of second order neuron type 3–5 (putative amacrine) follows the cone distribution as well with highest densities in the area ventro-temporalis (around 625 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$; Fig. 4J; see also Table 3). Density decreases towards the dorso-temporal and dorsal retina ($<150/10^4 \mu\text{m}^2$), the nasal periphery features a second smaller maximum of about 360 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$.

3.4. Inner plexiform layer

In 3D-fluorescence microscopy the IPL appears as the volume between the vitreal border of the INL and the scleral border of the G-cell layer (Figs. 2C, 2D and 3B). It mainly contains dendrites of A- and G-cells and the axons (with more or less swollen axon terminals) of the B-cells. Occasionally, single nuclei scattered in the IPL were observed (Fig. 2C). The background fluorescence shows a substratification of dense bands of finely granulated texture and intermediate blistered horizons (e.g. bipolar-terminals). The IPL thickness differs regionally, in most part of the retina it ranges between 30 and 50 μm with lowest values in the dorso-temporal and nasal periphery. Towards the ventro-temporal area it increases conspicuously and culminates in values as high as 70–80 μm (Tables 2 and 3; Fig. 4I).

3.5. Ganglion cell layer

Outside the ventro-temporal area, G-cell nuclei are arranged in a monolayer (Figs. 2C and 3B), whereas in the area they are some-

what staggered due to dense packing (Fig. 2D). In horizontal view (Fig. 1A) the GL-nuclei are not distributed homogeneously, but they are forming zones of varying density between small empty plaques. The GL contains nuclei of different neurons, most of them presumptive cone G-cells. Displaced A-cells should occur to a lesser extent, as well as some glia cells and endothelial cells.

Within the GL at least three morphotypes of nuclei can be distinguished drawing on the fluorescence aspect (Fig. 3H): (1) brightly stained, spherical nuclei of about 5.4–6.5 μm in diameter (prevailing in the area ventro-temporalis), (2) spherical nuclei of darker appearance about 6.5–9.9 μm in diameter, and (3) elongated, sometimes humpy nuclei with a mean length of about 8.6 μm and a frequency of 8–21% in the ventro-temporal area, and 11–36% in the remainder retina; these nuclei are expected to belong to glial or endothelial cells and were not counted for topography. In some regions, however, there is no clear border between the first two classes and nucleic diameter ranges from 5.4 to 9.5 μm continuously.

The highest G-cell density (including all spherical nuclei) was counted in the area ventro-temporalis with 150–162 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$ (in the mapping test Fig. 1 even up to 225 cells) and decreases by a factor of 5–10 towards the dorsal and ventro-nasal retina (<15 –30 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$; Tables 1 and 3; Fig. 4K and L). The dorso-nasal periphery features a second smaller maximum (>40 –60 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$). Some (glia) nuclei are found in the G-fibre layer vitreal to the GL, that shows the greatest thickness near the optic cleft (not shown).

3.6. Correlations

Since two-photon stacks comprise all nuclear (and hence cell) layers that belong to and are synaptically connected in a retinal volume element, the correlative analysis of density values and layer thicknesses is an appealing option, especially at the level of map-computations (here computed for the European anchovy with IDL, Fig. 5). This kind of mathematics can permit statements about regional differences of radial convergence and thus visual acuity in different sectors of the visual space, about the volumetric contribution of neurons to layer thicknesses and about the nature of cell subpopulations.

Fig. 5B shows the correlation map of the number of photoreceptors versus ONL-thickness. The lowest values are found in the ventro-temporal cone area, the highest values in the ventral rod area where much more small rod nuclei contribute to the same ONL volume. Hence we tend to term this map ONL compactness map. Fig. 5C demonstrates the potential of map arithmetic to extract cell subpopulations: putative amacrine and B1 cells are subtracted from the entirety of INL secondary neurons showing the distribution of arguable B2 cells. Fig. 5D illustrates the convergence of cones to ganglion cells, showing low convergence in the cone area and higher convergence in the rod area. Fig. 5E tries to correlate the number of cells contributing to the IPL (A + B + G) vs. IPL thickness (as proxy for its local volume). Here a maximum is found in the ventro-temporal quadrant standing out from an otherwise flat correlation. This maximum stands for a rather low dendritic and axonal volume per cell.

4. Discussion

4.1. Acquisition of fluorescence data

(1) *Local*. From the methodological side the primary concern of this study was to get digital 3D-data that contain clear nuclear images of all types of neurons in a given retinal subvolume suited for some classification and counting. Furthermore we

Table 4
Pros and cons of the two proved LSM-methods.

	Pros	Cons
CLSM	Good accessibility	To-Pro-3 is susceptible to bleaching
	Easy multispectral imaging ^a	Far-red emission limits resolution
	Tissue rather transparent in red light	Slicing needed Limited precision in determination of position
2PM	Great useful imaging depth	Limited accessibility
	Slow bleaching DAPI	Multispectral imaging ^a limited
	Blue emission improves resolution	Dye infiltration of the wholemount needs time
	Low preparation effort High precision in determination of position	

^a Needed e.g. for the combination of neuroanatomical and nuclear imaging.

looked for a sampling method to generate 3D-topographies as simple, time-saving and precise as possible. Well aligned stacks with good SNR, spatial resolution, position accuracy and sufficient sampling volume were available via laser scanning fluorescence microscopy. The “play” with the basic parameters (linear/non-linear excitation, spectral characteristics of the fluorescence dye and preparation method) disclosed two practicable approaches: (1) confocal microscopy on To-Pro-3 stained 75 μm radial vibratome sections: The strong scattering of excitation and emission light in fixed nervous tissue together with the signal loss by detection through a pinhole forces the use of long-wavelength fluorescence dyes and limits the useful imaging depth to less than 100 μm . The dissection of the retina hampers the determination of the scanning site positions within the retinal coordinate system. (2) Two-photon microscopy on DAPI-stained retinal wholemounts: This method on the one hand benefits from the great useful imaging depth (IR-excitation, detection of all scattered photons entering the aperture cone of the objective without pinhole), on the other hand from the easy preparation and precise determination of positions in a contiguous piece of tissue. For both methods a microscope stage with a calibrated digital display of X- and Y-position is required. We found no comparable attempt to investigate the 3D-nuclear pattern of the vertebrate retina published so far. The pros and cons of these two methods are summarized again in Table 4.

- (2) *Global*. In order to get a global picture of retinal cell topographies it is not mandatory to detect all cell nuclei entirely. According to the Nyquist–Shannon theorem a 2D-pattern has to be sampled with doubled maximally occurring space frequency for exact reconstruction. Applied to retinal topographies this may mean that local minima or maxima must not be overlooked or, in a stricter interpretation, that density gradients must be represented correctly. Retinal topographies have been investigated with 16 (O’Connell, 1963), 28 (Reckel et al., 2001), or up to several hundred sampling sites (e.g. Collin and Pettigrew, 1988a, b, c; Wikler et al., 1990; Ito et al., 1999; Calderone et al., 2003). We found that 30 sampling sites per retina (with increased density in regions of steep gradients) is sufficient, for the topographic picture of the retina does not change too much using more sampling sites (compare e.g. Fig. 4A vs. Fig. 7A in Heß, 2009). In any case it must be pointed out, that topographies obtained by linear interpolation of sampling sites spaced more or less from each other have probability character and precision increases with the density of sampling sites.

Very fine sampling with either gliding (Fig. 1H) or small counting windows (Fig. 1G) produces noisy topographies and displays narrow-range density fluctuations devoid of functional significance. For instance the local pattern of G-cell nuclei (Fig. 1A) does not follow the row pattern of photoreceptors due to an irregular displacement with respect to the centers of their dendritic fields. Counting windows of 30–100 μm edge length approved favourable for the display of smooth retinal cell-density contours.

4.2. Evaluation of fluorescence data

To approach an understanding of the 3D-distribution of retinal cell nuclei as a complex morphological character the information content of the raw-data has to be extracted at levels of increasing abstraction. According to the actual state-of-the-art the first step, i.e. classification and counting of cell nuclei (Heß, 2007) could not be accomplished automatically for all retinal layers. The most reliable procedure available to get the desired values (Tables 1–3) turned out to be the manual enumeration with the help of 3D-rendering software (tagging single nuclei in Amira®), albeit time-consuming and afflicted with some classification uncertainties. Amira® also helped to get precise thickness measurements due to the option of free rotation of the 3D-data stacks. The next step, i.e. the generation of iso-contour plots comfortably succeeds with simple IDL®-algorithms. Of course the aspect of the resulting maps depends on the selection of contour values and needs some subsequent smoothing. One has to be aware of a slight inaccuracy in the display of topographic maps (Figs. 4 and 5) resulting from the overlay of spread wholemounts with flat projections of hemispheric pol-coordinates. A very powerful and new option on the third abstraction level is the possibility to set different map against each other with any arithmetic operation desired. In principle topographic cell-density maps allow for the extrapolation of total cell numbers in the retina (see e.g. Andrade da Costa and Hokoç, 2000). Without a comparative approach (like comparing individuals, developmental stages or different species) this was irrelevant for the current investigation of *E. encrasicolus*.

4.3. Biological significance of the 3D-pattern of retinal cell nuclei

A detailed biological interpretation of the 3D-pattern of cell nuclei in the anchovy retina in terms of functional morphology will be amplified elsewhere. Here we intend to summarize some basic conclusions:

- (1) *Regional differences* in the density of photoreceptors (ONL) and inner retina neurons (INL and GL) are the indication of an heterogeneous sampling and processing of electromagnetic radiation patterns in different sectors of the visual space (i.e. regional differences in visual acuity, sensitivity, contrast formation, etc.). This originates from differing behavioural relevance of visual information from different directions relating to the coordinate system of the forward-oriented vertebrate body (here: teleost) and from the fine-tuning of all visual structures to this species-specific direction dependency in the photic habitat (see e.g. Collin, 1999).
- (2) The *cone density* gives a first clue about the potential visual acuity of the photopic system supported by a given retinal fragment (via interreceptor angles resulting from interreceptor distance and retinal curvature). The region of most acute vision, i.e. the “area”, comes within the ventro-temporal quadrant (Fig. 4A). It is characterized by steep gradients that concentrically peak in a little spot looking in the upper frontal visual space. The nuclei-based topography corresponds with the enumeration of ellipsoid profiles in cross-sections (Heß, 2009) and points to a visual focus-of-interest for the detection of small objects in the

- binocular field-of-view. It must be pointed out, that at least one long plus one short cone are needed (or a multiple) to analyze the light polarization of a single picture element.
- (3) A more precise estimation of visual acuity, however, has to consider the receptive fields of *ganglion cells* as they define the final grid for the spatial sampling of the visual stimulus. Obviously there is some interindividual variation concerning maximum density and fine-structure of topography (compare Fig. 4K and L; see also Fig. 1E–J) but the general picture persists. From the values obtained here, a potential angle-resolution of 0.15° can be calculated for the cone area of *E. encrasicolus*. The actual resolution will be somewhat coarser because certain fractions of the GL-nuclei belong to displaced A-cells (Mack et al., 2004) and astroglia (up to 20%, see Collin and Pettigrew, 2004). Even though different morphotypes of cell nuclei were visible in the GL (Fig. 3H) we had little clues for a differentiated classification. At least we excluded conspicuously elongate nuclei (Fig. 1) and some irregularly shaped putative glia nuclei (Fig. 3H) from counting. The area of acute vision comes along with low cone to ganglion cell convergence (Fig. 5D), like in the area of other teleosts (Miyazaki et al., 2002), elasmobranchs (Litherland and Collin, 2008), the cat (Steinberg et al., 1973) and the hyena (Calderone et al., 2003; only for M/L-cones). A rather high cone convergence in the ventral quadrant (Fig. 5D) can tell about both, a cone region of increased sensitivity (e.g. triple cone region: Heß, 2009) or, more likely, a side effect of the highly convergent rod area.
 - (4) Density distribution maps of vertebrate *rod photoreceptors* are rarely published (e.g. Curcio et al., 1990; Wikler et al., 1990; Chandler et al., 1999; Andrade da Costa and Hokoç, 2000; Calderone et al., 2003) because they are accessible via classical light-microscopy only in monolayers. For *E. encrasicolus* we can estimate regional rod density variations via the ONL-thickness (Fig. 4C) or determine rather precise topographies by counting rod nuclei directly (Fig. 4B). The maxima in the ventral to dorso-temporal retina are much less circumscribed than the cone areae, nevertheless they point to increased light sensitivity of the highly convergent scotopic system (see e.g. Sterling et al., 1988) in the frontal and dorsal visual field. This can be deduced from the coincidence of rod maxima with G-cell minima and the fact that the scotopic system is connected piggyback to the G-cells originally belonging only to the photopic system (see e.g. Lamb, 2009). Besides, a kind of spatial “competition” of cones and rods gets visible in their reciprocal topographies (compare Fig. 4B and C).
 - (5) Also topographic mapping of *retinal interneurons* was undertaken rarely (H-cells: Wässle et al., 2000; B-cells: Euler and Wässle, 1995; A-cells: Zhang et al., 2004) and interpretations were phrased very cautious: e.g. “...the spatial arrangement of each cell type ... might contribute to local circuit wiring ...” (Zhang et al., 2004). In *E. encrasicolus* the density of all mapped subpopulations of interneurons (Fig. 4D, E, G, H and J; including Müller cells) follow a pattern similar to that of cones and G-cells (Fig. 4A and K) suggesting a proliferation pattern common to all neurons of the photopic system. Moreover the ratio of H, B and A cells to cones is increased in the cone area indicating lowered convergence and/or more complex computing. Second order neurons of the highly convergent scotopic system, generally outnumbered by those of the photopic system, could not be uncovered with the methods presented here. Whether the B2 nuclei, classified morphologically with reservations and going with the rod topography in the ventral and temporal retina (Fig. 5C), are rod-bipolars or not remains to be clarified e.g. by PKC α antibody staining.
 - (6) The thickness topography of the IPL should contain information about convergence and integrative power of different retinal

subvolumes, for it is governed by the number of contributing cells and by the degree of horizontal arborisation of interneurons (primarily A-cells) and G-cells. The IPL is formed by the dendrites of the amacrine and G-cells and the axons of the B-cells. Its thickness (Fig. 4I) roughly follows the sum of B-, A-, and G-cells, with unexpected low values in the cone area. The correlation map of the number of contributing cells vs. IPL thickness (as proxy for its local volume) is shown in Fig. 5E. Here a maximum is found in the ventro-temporal quadrant standing out from an otherwise flat correlation. This maximum stands for a rather low dendritic and axonal volume per cell (e.g. low extend of horizontal arborizations, small synaptic B-terminals) and again supports the idea of low convergence for acute cone vision.

4.4. Outlook

The methods of 3D-imaging and evaluation of cell nuclei patterns in the vertebrate retina presented here are going to be refined stepwise towards a better classification of cell types (shape analysis, combination with neuroanatomical stainings) and towards a more detailed analysis of nearest neighbour distances (see also Heß, 2007). It may get a tool for automated retina analyses and/or adapted to other biological tissues (see e.g. Malone et al., 2002) or to 4D tracking applications for in-vivo imaging.

Acknowledgment

This study was supported by a grant of the Deutsche Forschungsgemeinschaft to MH (HE 5428).

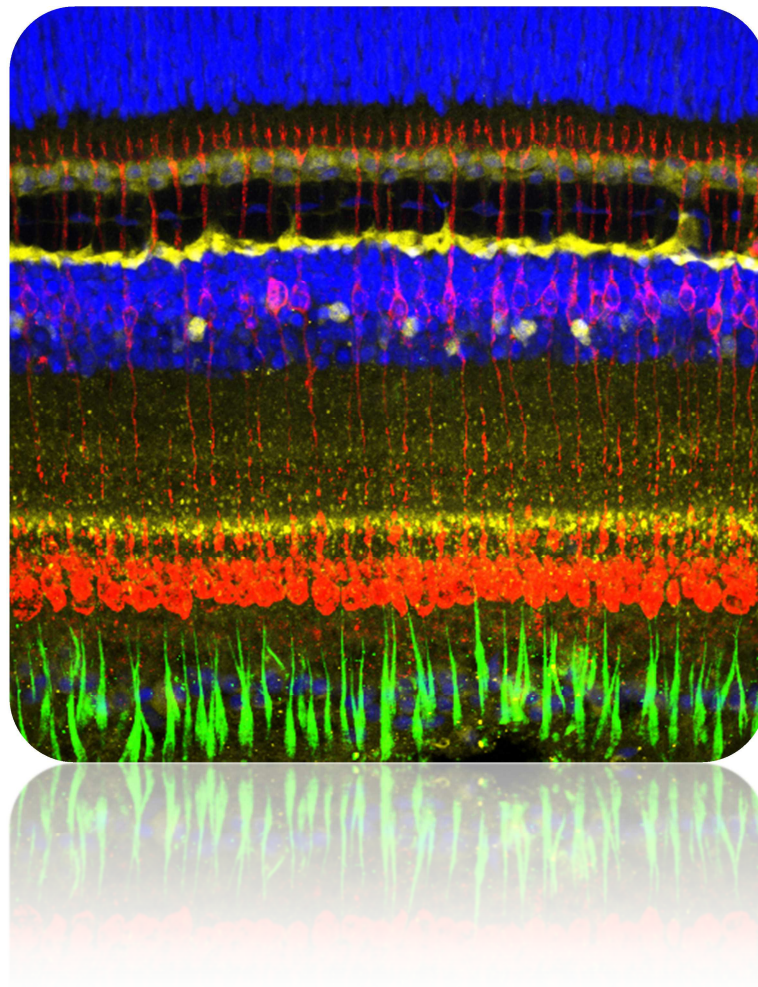
References

- Ali MA. Vision in fishes—new approaches in research. New York: Plenum Press; 1975. p. 836.
- Andrade da Costa BLS, Hokoç JN. Photoreceptor topography of the retina in the New World monkey *Cebus apella*. Vis Res 2000;40:2395–409.
- Archer SN, Djamgoz MB, Loew E, Partridge JC, Vallerga S. Adaptive mechanisms in the ecology of vision. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1999. p. 690.
- Beaudet L, Novales Flamarique I, Hawryshyn CW. Cone photoreceptor topography in the retina of sexually mature pacific salmonid fishes. J Comp Neurol 1997;383:49–59.
- Borwein B. The retinal receptor: a description. In: Enoch JM, Tobek Jr FL, editors. Vertebrate photoreceptor optics. Berlin: Springer; 1981. p. 11–69.
- Calderone JB, Reese BE, Jacobs GH. Topography of photoreceptors and retinal ganglion cells in the spotted hyena (*Crocuta crocuta*). Brain Behav Evol 2003;62:182–92.
- Chandler MJ, Smith PJ, Samuelson DA, Mackay EO. Photoreceptor density of the domestic pig retina. Vet Ophthalmol 1999;2:179–84.
- Collin SP, Pettigrew JD. Retinal topography in reef teleosts: I. Some species with well-developed areae but poorly-developed streaks. Brain Behav Evol 1988a;31:269–82.
- Collin SP, Pettigrew JD. Retinal topography in reef teleosts: II. Some species with prominent horizontal streaks and high-density areae. Brain Behav Evol 1988b;31:283–95.
- Collin SP, Pettigrew JD. Retinal ganglion cell topography: Nissl und retrograde labelling. J Comp Neurol 1988c;276:412–22.
- Collin SP. Topographic organization of the ganglion cell layer and intraocular vascularization in the retinae of two reef teleosts. Vis Res 1989;29:765–75.
- Collin SP. Behavioural ecology and retinal cell topography. In: Archer SN, Djamgoz MB, Loew E, Partridge JC, Vallerga S, editors. Adaptive mechanisms in the ecology of vision. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1999. p. 509–35.
- Collin SP, Pettigrew JD. Retinal ganglion cell topography in teleosts: a comparison between Nissl-stained material and retrograde labelling from the optic nerve. J Comp Neurol 2004;276:412–22.
- Cook JE, Becker DL. Regular mosaics of large displaced and non-displaced ganglion cells in the retina of a cichlid fish. J Comp Neurol 1991;306:668–84.
- Curcio CA, Packer O, Kalina RE. A whole mount method for sequential analysis of photoreceptor and ganglion cell topography in a single retina. Vis Res 1987;27:9–15.
- Curcio CA, Sloan KR, Kalina RE, Hendrickson AE. Human photoreceptor topography. J Comp Neurol 1990;292:497–523.
- Douglas RH, Collin SP, Corrigan J. The eyes of suckermouth armoured catfish (Loricariidae, subfamily Hypostomus): pupil response, lenticular longitudinal spherical aberration and retinal topography. J Exp Biol 2002;205:3425–33.
- Dowling JE. The retina—an approachable part of the brain. Cambridge: Belknap Press of Harvard University Press; 1987. p. 282.

- Euler T, Wässle H. Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina. *J Comp Neurol* 1995;361:461–78.
- Fineran BA, Nicol JAC. Novel cones in the retina of the anchovy (*Anchoa*). *J Ultrastruct Res* 1976;54:296–303.
- García M, Ruiz-Ederra J, Hernández-Barbáchano H, Vecino E. Topography of pig retinal ganglion cells. *J Comp Neurol* 2005;486:361–72.
- Heß M, Melzer RR, Smola U. The pattern of cone pedicles and horizontal cells in the retina of the European anchovy, *Engraulis encrasicolus* L. (Engraulidae, Clupeiformes). *J Submicrosc Cytol Pathol* 2002;34:355–65.
- Heß M, Melzer RR, Eser R, Smola U. The structure of anchovy outer retinae—a comparative light- and electron-microscopic study with museum-stored material. *J Morphol* 2006;267(11):1356–80.
- Heß M. Semi-automated mapping of cell nuclei in 3D-stacks from optical-sectioning microscopy. *Lect Notes Comput Sci* 2007;4826:156–64.
- Heß M. Triple cones in the retinae of three anchovy species: *Engraulis encrasicolus*, *Cetengraulis mysticetus* and *Anchoa macrolepidota* (Engraulidae, Teleostei). *Vis Res* 2009;49:1569–82.
- Ito H, Yoshimoto M, Albert JS, Yamamoto N, Sawai N. Retinal projectons and retinal ganglion cell distribution patterns in a strugeon (*Acipenser transmontanus*), a non-teleost actinopterygian fish. *Brain Behav Evol* 1999;53:127–41.
- Kryger Z, Galli-Resta L, Jacobs GH, Reese BE. The topography of rod and cone photoreceptors in the retina of the ground squirrel. *Vis Neurosci* 1998;15:685–91.
- Lamb TD. Evolution of vertebrate retinal photoreception. *Philos Trans R Soc B* 2009;364:2911–24.
- Litherland L, Collin SP. Comparative visual function in elasmobranchs: spatial arrangement and ecological correlates of photoreceptor and ganglion cell distributions. *Vis Neurosci* 2008;25:549–61.
- Lythgoe JN. The ecology of vision. Oxford: Clarendon Press; 1979. p. 270.
- Mack AF, Süssmann C, Hirt B, Wagner HJ. Displaced amacrine cells disappear from the ganglion cell layer in the central retina of adult fish during growth. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:3749–55.
- Malone JC, Hood AF, Conley T, Nürnberger J, Baldridge LA, Clendenon JL, et al. Three-dimensional imaging of human skin and mucosa by two-photon laser scanning microscopy. *J Cutan Pathol* 2002;29:453–8.
- Miyazaki T, Iwami T, Somiya H, Meyer-Rochow VB. Retinal topography of ganglion cells and putative UV-sensitive cones in two Antarctic fishes: *Pagothenia borghgrevinkii* and *Trematomus bernacchii* (Nototheniidae). *Zool Sci* 2002;19:1223–9.
- Novales-Flamarique I, Harosi FI. Visual pigments and dichroism of anchovy cones: a model system for polarization detection. *Vis Neurosci* 2002;19:467–73.
- O'Connell CP. The structure of the eye of *Sardinops caerulea*, *Engraulis mordax*, and four other pelagic marine teleosts. *J Morphol* 1963;113:287–329.
- Østerberg G. Topography of the layer of rods and cones in the human retina. *Acta Ophthalmol* 1935;Suppl. 13:1–102.
- Reckel F, Melzer R, Smola U. Outer retinal fine structure of the garfish *Belone belone* (L.) (Belonidae, Teleostei) during light and dark Adaptation—photoreceptors, cone patterns and densities. *Acta Zool* 2001;82:89–105.
- Schivitz AN, Ruf T, Kuebber-Heiss A, Schubert C, Ahnelt PK. Retinal cone topography of artiodactyl mammals: influence of body height and habitat. *J Comp Neurol* 2008;507:1336–50.
- Sjöstrand J, Conradi N, Klarén L. How many ganglion cells are there to a foveal cone? *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1994;32:432–7.
- Steinberg RH, Reid M, Lacy PL. The distribution of rods and cones in the retina of the cat (*Felis domesticus*). *J Comp Neurol* 1973;148:229–48.
- Sterling P, Freed MA, Smith RG. Functional architecture of rod and cone circuits to the on-beta ganglion cell. *J Neurosci* 1988;8:623–42.
- Wässle H, Dacey DM, Haun T, Haverkamp S, Grünert U, Boycott BB. The mosaic of horizontal cells in the macaque monkey retina: with a comment on biphaseform ganglion cells. *Vis Neurosci* 2000;17:591–608.
- Wikler KC, Williams RW, Rakic P. Photoreceptor mosaic: number and distribution of rods and cones in the rhesus monkey retina. *J Comp Neurol* 1990;292:499–508.
- Zaunreiter M, Junger H, Kotschal K. Retinal morphology of cyprinid fishes: a quantitative histological study of ontogenetic changes and interspecific variation. *Vis Res* 1991;31:383–94.
- Zhang J, Yang Z, Wu SM. Immunocytochemical analysis of spatial organization of photoreceptors and amacrine and ganglion cells in the tiger salamander retina. *Vis Neurosci* 2004;21:157–66.

3.3 Topographic mapping of retinal neurons in the European anchovy by nuclear staining and immunohistochemistry

Petra C. Koch, Martin Heß



Publiziert als:

Koch PC & Heß M (2011). Topographic mapping of retinal neurons in the European anchovy by nuclear staining and immunohistochemistry.

Journal of Neuroscience Research 89: 1316–1330.

Topographic Mapping of Retinal Neurons in the European Anchovy by Nuclear Staining and Immunohistochemistry

Petra Christiane Koch and Martin Heß*

BioZentrum LMU, Planegg, Germany

The anchovy retina is unique among vertebrates in being designed for polarization-contrast vision and has a marked cone area in the ventrotemporal quadrant for acute vision in the frontal field of view. Whereas cone topography and fine structure have been well examined in the European anchovy, the morphological organization of its inner retina is poorly understood so far. Using fluorescence staining of cell nuclei in combination with antibody stainings, the 3D pattern of cell nuclei was recorded coevally in all three retinal cell layers by confocal laser scanning microscopy, and the topographies of several neuron types were mapped separately across the retina. Cell classification and quantification succeeded for rods, cones, three types of horizontal cells (H1–3), rod and cone bipolars, amacrine cells, and displaced amacrine cells as well as Müller cells; moreover, the morphology of H1 horizontal cells (calretinin-positive), rod bipolars (protein kinase C-positive), and a subtype of cone bipolars (parvalbumin-positive) is shown. Most cell types follow the cone topography, with a cell density maximum in the ventrotemporal quadrant (e.g., 730 cones, 2,800 cone bipolars, 230 GCL cells per $10^4 \mu\text{m}^2$), showing their affiliation to the photopic system, except rods and rod bipolars (showing a cell density minimum in the cone area). The correlation of density maps of different cell types provides insight into convergence and divergence patterns in cone and rod pathways. © 2011 Wiley-Liss, Inc.

Key words: visual acuity; convergence; area centralis; confocal microscopy; polarization vision

The complex structure of the vertebrate retina is revealing in terms of its functional morphology and etho-ecological adaptations (see, e.g., Lythgoe, 1979; Archer et al., 1999), not least in anchovies, which are among the few vertebrates with supposed polarization-contrast vision. Forming radially aligned outer segment lamellae with an orthogonal orientation between neighboring cells, their cone photoreceptors should act as two-channel analyzers for the e-vector orientation of axially incident light, supported by polarizing tapetal reflectors (Fineran and Nicol, 1976, 1978), a hypothesis that has already been supported by some physiological and biophysical experiments (Novales Flamarique and

Hawryshyn, 1998; Novales Flamarique and Harosi, 2002). The peculiar ultrastructural geometry of cone outer segment membranes and mirror platelets is most pronounced in the cone area (Heß, 2000; Novales-Flamarique, 2011), suggesting a nonaccidental coincidence of high acuity and polarization sensitivity, provided that the inner retina supports these functions as well (parallel processing, low cone–ganglion cell convergence).

Although the histology and fine structure of the outer retina (i.e., the layer between pigment epithelium and outer limiting membrane) of anchovies has been well examined (Fineran and Nicol, 1978; Zueva, 1980; Haacke et al., 2001; Heß et al., 2002, 2006; Heß, 2009), the morphological organization of the inner retina between outer and inner limiting membrane has been investigated so far only in outline (O’Connell, 1963; Heß et al., 2002). A feasible method to elucidate the organization of the inner retina in more detail and to learn more about species-specific adaptations of the visual system to the demands of visually guided behavior in the photic habitat is the local and global analysis of cell densities and cell density ratios via analysis of the three-dimensional arrangement of cell nuclei as introduced by Koch et al. (2010). Because neighboring retinal neurons are synaptically linked in radial and horizontal direction, the nuclear pattern indirectly mirrors some wiring rules of local retinal subvolumes (e.g., convergence, parallel processing). Moreover, global cell topographies provide evidence about regional adaptations to differences in quality and behavioral relevance of light from different sectors in visual space (see, e.g., Collin, 1999). This effect concerns pigment epithelium and tapetum (Braekevelt et al.,

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Contract grant sponsor: Deutsche Forschungsgemeinschaft; Contract grant number: HE 5428 (to M.H.).

*Correspondence to: PD Dr. Martin Heß, BioZentrum LMU, Großhaderner Straße 2–4, 82152 Planegg, Germany.
E-mail: hess@bio.lmu.de

Received 29 November 2010; Revised 14 February 2011; Accepted 2 March 2011

Published online 3 May 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jnr.22651

TABLE I. Sources and Working Dilutions of Antibodies and Other Fluorescent Dyes

Primary antibody	Source	Dilution	Secondary antibody	Dilution	Source
Mouse anti-calretinin (Calr _m)	Swant (Bellinzona, Switzerland)	1:1,000	Goat anti-mouse IgG + AlexaFluor 555 or 488	1:200	Molecular Probes (Eugene, OR)
Rabbit anti-calretinin (Calr _r)	Swant	1:1,000	Goat anti-rabbit IgG + AlexaFluor 555	1:200	Molecular Probes
Chicken anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP)	Abcam (Cambridge, United Kingdom)	1:200–1:500	Goat anti-chicken IgG + AlexaFluor 488	1:200	Molecular Probes
Goat anti-glutamine synthetase (Gl Syn)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)	1:50–1:500	Chicken anti-goat IgG + Alexa Fluor 488	1:200	Molecular Probes
Rabbit anti-parvalbumin (Parv _r) (immunogen: rat skeletal muscle)	Abcam	1:1,000	Goat anti-rabbit IgG + AlexaFluor 488	1:200	Molecular Probes
Mouse anti-parvalbumin (Parv _m) (immunogen: frog muscle)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)	1:1,000	Goat anti-mouse IgG + AlexaFluor 555	1:200	Molecular Probes
Rabbit anti-protein kinase C (PKC)	MBL International Corporation (Woburn, MA)	1:200	Goat anti-rabbit IgG + AlexaFluor 633	1:200	Molecular Probes
Additional dyes					
DAPI	Molecular Probes	1:500			
To-Pro-3	Molecular Probes	1:500			
Wheat germ agglutinin (WGA) + Texas red	Molecular Probes	1:50			

1989; Somiya et al., 2000), the occurrence of different photoreceptor types (Reckel et al., 2001; Reckel and Melzer, 2003; Heß, 2009), horizontal and radial photoreceptor patterns (Engström, 1963; Locket, 1985), photoreceptor density (Collin and Pettigrew, 1988a,b), and organization of the inner retina (bipolar cells: Euler and Wässle, 1995; horizontal cells: Wässle et al., 2000; amacrine and ganglion cells: Zhang et al., 2004).

Following the preparatory study of Koch et al. (2010), we apply optical sectioning fluorescence microscopy and analysis of 3D patterns of cell nuclei to the retina of the European anchovy *Engraulis encrasicolus*, to get a thorough picture of the topography and ratios of most retinal cell types. Pure DNA staining of cell nuclei, however, allows for only a rough classification of different retinal cell types (via position, size, shape, and fluorescence staining pattern); the discrimination of rod vs. cone bipolars, ganglion cells vs. displaced amacrine, or Müller cells vs. amacrine remains highly uncertain if not impossible. To overcome these restrictions, in this study we expand the method by additional immunohistochemical stainings to 1) refine cellular classification particularly in the inner nuclear layer (INL), 2) obtain morphological information about some secondary neuron subtypes, and 3) reveal certain wiring aspects of the anchovy retina.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Tissue Preparation

Specimens of adult European anchovy, *Engraulis encrasicolus* (L., 1758), with a standard length (SL) = 16.5 cm were obtained from local purse seine fishermen (Rovinj, Croatia, northern Adriatic), returning around dawn from night catches. Eyes were enucleated immediately, and lens, cornea, and vitreous were removed. The eyecups were fixed in 4% formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.2) and stored at

4°C. Flat retinal whole mounts with nine radial incisures (see Figs. 3A, 4A) were prepared, photographed, and cut into nine sectors. After we had embedded the retinal sectors in 4% agarose, radial 45 µm slices were cut with a Leica VT1000S vibratome, and two slices along the bisecting line of each sector were kept in PB for further processing (see also Koch et al., 2010: Figs. 2A,B).

Immunohistochemistry

The antibody sources and working dilutions used in this study are listed in Table I. For immunolabeling, the vibratome sections were rinsed in PB and then blocked for 1 hr at room temperature in a solution containing 3% normal goat serum (NGS), 0.5% Triton X-100, and 0.1% saponin. The primary antibodies were diluted in PB and applied for 2 days at room temperature on a slowly moving shaker. After repeated washes in PB, secondary antibodies were applied for 1.5 hr at 37°C. These were conjugated to AlexaFluor 488, AlexaFluor 555, or AlexaFluor 633. Again the sections were rinsed in PB, incubated 40 min in DAPI or To-Pro-3 (1:500; Molecular Probes, Eugene, OR), embedded in VectaShield (Vector Laboratories, Burlingame, CA), coverslipped, and sealed with nail polish.

For multifuorescence labeling experiments, sections were incubated in a mixture of primary antibodies followed by a mixture of appropriate secondary antibodies: anti-PKC-AlexaFluor 633 + anti-calretinin-AlexaFluor 555 + anti-GFAP-AlexaFluor 488 + DAPI ($\lambda_{\text{max}}\text{em} = 461\text{ nm}$) or anti-Parv_{rabbit}-AlexaFluor 488 + anti-Parv_{mouse}-AlexaFluor 555 + To-Pro-3 ($\lambda_{\text{max}}\text{em} = 661\text{ nm}$). Because mouse anti-calretinin labeling is often very faint at locations off the ventrotemporal quadrant, rabbit anti-calretinin was separately applied to enhance the signal yield for separating horizontal cells throughout the retina. To visualize synaptic contact sites of bipolar cells in cone pedicles and rod spherules, some immunolabeled sections were additionally incubated in a solution of

wheat germ agglutinin (WGA) conjugated with Texas red ($\lambda_{\text{max}} = 605 \text{ nm}$) for 30 min at room temperature.

Confocal Laser Scanning Microscopy

The immunolabeled sections were investigated with a Leica SP5 AOBS, using either a $\times 40$ HCX Apo L U-V-I water-dipping objective (NA = 0.8) or a $\times 63$ HCX PL Apo CS water-immersion objective (NA = 1.2). The stacks generated had an x-y-z resolution (voxel size) of $250 \times 250 \times 760 \text{ nm}$ or $300 \times 300 \times 880 \text{ nm}$. Given a field of view of 512×512 pixels (resulting edge length $128.0 \text{ }\mu\text{m}$ or $153.6 \text{ }\mu\text{m}$), most sampling sites were composed of two 3D stacks to receive data from outer limiting membrane to the ganglion cell layer (GCL; distance in radial view up to $250 \text{ }\mu\text{m}$). After choosing three to six sampling sites per section, the center coordinate of each stack was determined with the digital stage display of the SP5 and plotted in the coordinate system of a photograph of the original whole mount. Because DAPI shows a broad emission range, it was scanned separately for each stack to avoid cross-talk. Gain and offset were manually optimized with increasing scanning depth. Several retinas were used for optimization of the immunohistochemistry (IHC) and inspected at different positions. For the generation of complete 3D data sets and consistent mapping, finally two retina whole mounts (left eyes) were selected, one for the DAPI + PKC + calretinin + GFAP staining and mapping of outer nuclear layer thickness (ONL; whole mount, Fig. 3A; see also Figs. 1A–C, 2A, 3B–L, 4G–I), and another for both the Parv_{rabbit} + Parv_{mouse} double staining and the H1/2 horizontal cell mapping with calretinin IHC (using separate neighboring radial slices; whole mount, Fig. 4A; see also Figs. 1D–G, I, J, 2B, 4B–F). In fact, these topographies describe the conditions in two single anchovy eyes only, and some interindividual variability in the course of isodensity lines is possible. On the other hand, there is strong evidence for the stability of the general topographic pattern of retinal cells in anchovies (Supp. Info. Fig. 1; see also cone topographies documented by O'Connell (1963), Heß et al. (1998), Heß (2009), and Koch et al. (2010).

Counting Cells and Mapping

Counting and mapping procedures followed a previously published article (Koch et al., 2010). In brief, the image stacks were imported into 3D-rendering software (Amira[®]) to facilitate cell counting. After defining rectangular counting windows, every single nucleus or immunolabeled cell body that was situated more than 50% within the counting volume was labeled manually in all planes and color coded according to the cell type. Altogether, 24,569 cell nuclei were counted in this study (10,415 rods, 1,488 cones, 1,820 H cells, 5,768 B cells, 2,625 A cells, 770 M cells, 1,683 GCL cells) to generate the tables and maps (Figs. 3, 4). Classification of cell types not sensitive to immunolabeling was carried out by the evaluation of radial position, size, shape, and staining pattern of the nuclei (Fig. 2C–E). Within the GCL, all spherical and irregularly shaped nuclei were labeled; conspicuously elongated nuclei at the very vitreal margin of the GCL (Fig. 2E, arrowhead) were excluded (e.g., neuroglia: Hughes, 1981; Collin,

1989). Layer thicknesses and nuclear diameters were measured directly in Amira[®] software.

For topographic mapping, the polar coordinates for each sampling site were determined. Isodensity maps (cells) and isometric contour maps (layer thicknesses) were generated with IDL 7.0 (Interactive Data Language; ITT Corp.) by interpolation between the values of each sampling site. Two obviously erroneous values from the GCL (positions 24 and 26 in Fig. 3A) were omitted to avoid strange local deformations of the contour lines. The maps were slightly smoothed manually (i.e., polygonal contour lines from the IDL display were drawn curved), scanned again, and matched to photographs of the original whole mounts in Photoshop CS4. To illustrate the local ratios of some cell types, contour maps of correlative values were generated using self-programmed IDL algorithms.

RESULTS

Staining With Nuclear Dyes and Gross Classification of Cell Types

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) examination of radial sections through the anchovy retina stained with DNA-specific fluorescence dyes (DAPI or To-Pro-3) revealed the 3D pattern of cell nuclei within a local subvolume corresponding to the microscopic field of view. As in other vertebrates, three distinct nuclear layers were found: the ONL containing photoreceptor cell nuclei; the INL containing the nuclei of second-order neurons (horizontal cells, bipolars, amacrine) as well as Müller cell nuclei; and the GCL involving ganglion cells, displaced amacrine, and some glial and endothelial cell nuclei (Fig. 1A–F). Gross classification of cell types was achieved exploiting retinal layering and nuclear morphology (Fig. 2C–E). At different locations within the retinal hemisphere, the nuclear layers vary in cell density, composition, and thickness (compare, e.g., Figs. 1C and 2A); the latter is also true for the inner plexiform layer (IPL).

In radial view, the compact ONL comprises predominantly bright ovoid rod nuclei interspersed with radially elongated, faintly stained cone nuclei (Fig. 2C). The shape of photoreceptor nuclei is strongly affected by the density of their package. Thus, the radial length of rod nuclei ranges from $4.0 \text{ }\mu\text{m}$ to $8.5 \text{ }\mu\text{m}$ (mean diameter $4\text{--}5 \text{ }\mu\text{m}$), and that of cones ranges from $11 \text{ }\mu\text{m}$ to $25 \text{ }\mu\text{m}$. Because these clear differences, photoreceptor cell nuclei could easily be distinguished, and no further labeling was necessary.

In *E. encrasicolus*, the INL is subdivided into two distinct layers; sclerally three types of horizontal cell nuclei (H1–3 following the nomenclature of Heß et al., 2002; Fig. 4D) are clearly separated by glial fibres (Fig. 1A, J) from the tightly packed other second order neurons (bipolars, amacrine) and Müller cell nuclei, which build up the INL sensu stricto (see Figs. 1D, G, 2D).

In the ventrotemporal quadrant, the H1 and H2 nuclei (lying farthest scleral, mean diameters $7 \text{ }\mu\text{m}$ and $8 \text{ }\mu\text{m}$, respectively) build up two separate layers spaced up

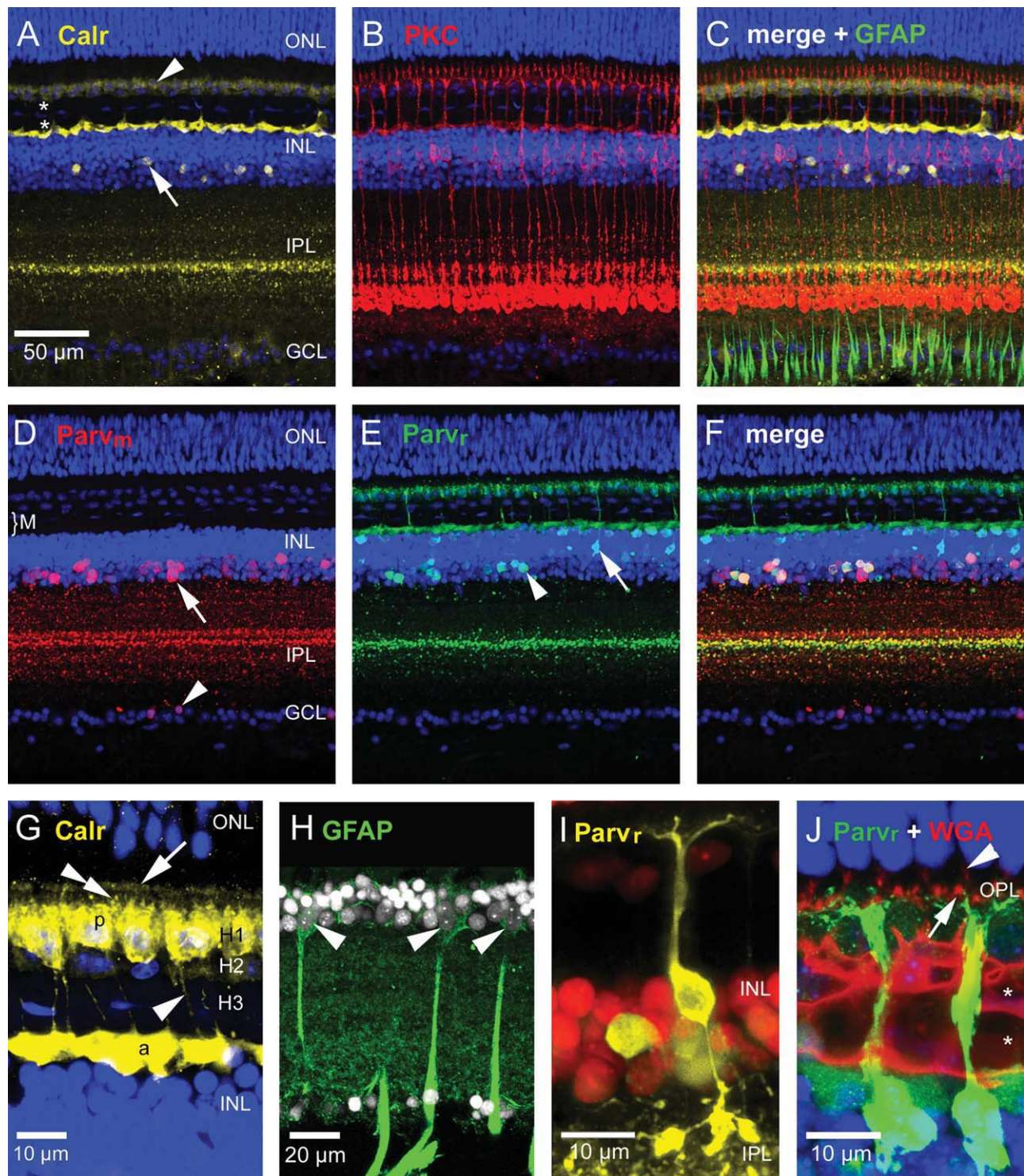


Fig. 1. Confocal micrographs of radial vibratome sections through the anchovy retina (brightest point projections of several confocal planes). Sections are immunolabeled for calretinin (Calr), PKC, GFAP, mouse parvalbumin (Parv_m), and rabbit parvalbumin (Parv_r). Nuclei are stained with DAPI (blue, white) or To-Pro-3 (red); M (Müller-cell fibers) and synaptic sites are stained with WGA (J). Retinal layers are indicated as ONL (outer nuclear layer), OPL (outer plexiform layer), INL (inner nuclear layer), IPL (inner plexiform layer), and GCL (ganglion cell layer). **A:** Section of the ventrotemporal quadrant, near the area ventrotemporalis (sampling site 3 in Fig. 3A). Anti-calretinin (yellow) labels horizontal cells (arrowhead) with axons and axon terminals, a subpopulation of amacrine (arrow), a synaptic horizon in the middle of the IPL, and occasionally a few cells of the GCL. *Two layers of glial fibers bordering the horizon of H3 nuclei (see also J). **B:** Same section as in A. Anti-PKC (red) strongly labels a subpopulation of bipolar cells terminating in the inner half of the IPL near the ganglion cells. Axon terminals are knob shaped. **C:** Overlay of A and B and immunolabeling with anti-GFAP (green). Anti-GFAP labels Müller cells, especially the proximal parts (stalks) near their endfeet. **D:** Section of the ventrotemporal quadrant, near the area

ventrotemporalis. Anti-Parv_m (red) strongly labels a subpopulation of amacrine in the vitreal half of the INL (arrow) and a double band of synaptic sites in the middle of the IPL. Occasionally scattered cells in the GCL are weakly labeled (arrowhead). **E:** Same section as in D. Anti-Parv_r (green) strongly labels H1 cells, subpopulations of bipolars in the scleral half of the IPL (arrow), amacrine in the vitreal half of the INL (arrowhead), and a synaptic horizon in the middle of the INL. **F:** Overlay of D and E. **G:** Anti-calretinin-labeled horizontal cells 1 (H1). Perikarya (p), axons (single arrowhead), and axon terminals (a) are strongly labeled. Arrow, level of long cone pedicles; double arrowhead, level of short cone pedicles. Horizontal cells 2 and 3 (H2, H3) are not or occasionally weakly labeled. **H:** GFAP-immunoreactive Müller cells (green) and putative Müller cell nuclei (arrowheads) at the vitreal border of the INL. **I:** Anti-Parv_r-positive cone bipolar from the retinal periphery. **J:** Cone connectivity of anti-Parv_r-positive bipolars. Dendrites apparently reach synaptic sites of cone pedicles (arrow) as revealed by WGA staining (red). No contacts with rod spherules (arrowhead) can be observed. *Two layers of glial fibers bordering the horizon of H3 nuclei (see also A).

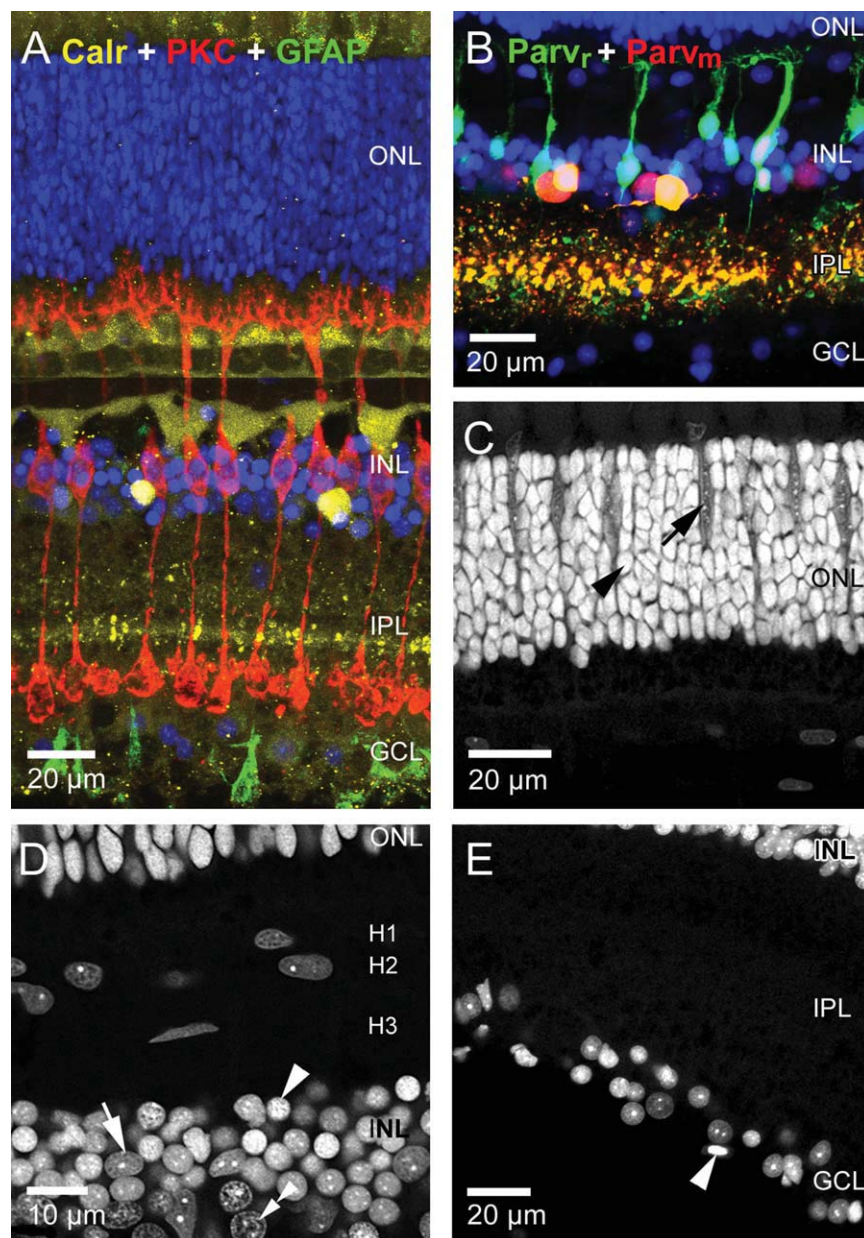


Fig. 2. Confocal micrographs of radial vibratome sections through the anchovy retina. Immunolabeling as in Figure 1; nuclei are stained with DAPI (blue, white). **A:** Section of the ventral quadrant near the rod maximum (sampling site 36 in Fig. 3A). Cells are labeled as described for Figure 1A–C. Note the thicknesses of ONL resulting from rod maximum and of INL resulting from second-order neurons' minimum (see Fig. 3). **B:** Section of the ventral quadrant near the rod maximum (sampling site 34 in Fig. 4A). Cells are labeled as described for Figure 1D–F. **C:** ONL of a DAPI-stained section of the dorsal retina. The larger cone nuclei are radially elongated with weak fluorescence (arrow); the small rod nuclei are spherical in shape and show bright

fluorescence (arrowhead). **D:** INL of a DAPI-stained section of the ventrotemporal quadrant. H1–3 are easy to distinguish because of their radial position. Nuclei of cone bipolars are located in the scleral half of the INL sensu stricto and appear small, spherical, and bright after DAPI staining (single arrowhead), whereas those of rod bipolars are larger and less bright (arrow). In the vitreal half of the INL, the larger, spherical, and more weakly stained amacrine nuclei occur (double arrowhead). **E:** GCL (and IPL) of a DAPI-stained section of the ventrotemporal quadrant. Nuclei of the GCL are diverse in shape, size, and fluorescence brightness. The arrowhead marks a presumable neuroglial cell nucleus that was not counted for the GCL map.

to 8 μ m. In other parts of the retina this separation was less distinct or absent and the nuclei are larger (diameters 10–13 μ m). The strongly flattened H3 nuclei (max. diameter 10–15 μ m; Fig. 2D) are embedded amid the stratum of Müller-glia-fibers (Fig. 1A,J).

Within the compact part of the INL, a first classification to distinguish roughly bipolars from amacrine and Müller cells was carried out by position, shape, size, and staining pattern of DAPI/To-Pro-3-stained nuclei (Fig. 2D). The numerous bright, spherical, small nuclei

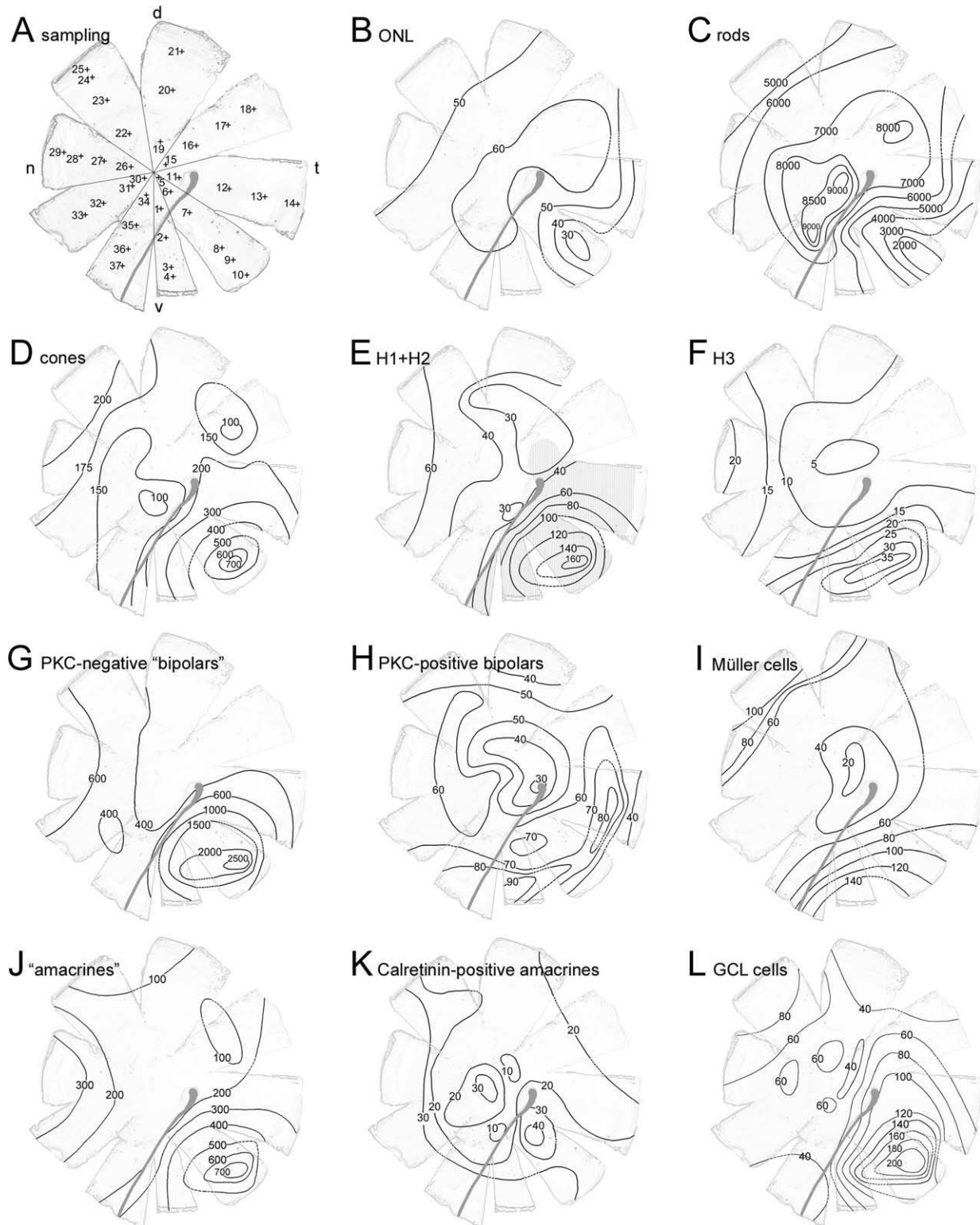


Fig. 3. Topography of ONL thickness (**B**) and cell densities of various retinal cell types (**C–L**) classified by nuclear staining (DAPI) and simultaneous immunolabeling for PKC, calretinin, and GFAP. Densities are values per $10^4 \mu\text{m}^2$. Maps are plotted on the original whole mount; however, counts were drawn on the basis of vibratome sections and confocal image stacks. Measurements were carried out at 37 sampling sites (**A**). The optical cleft is depicted in gray. For further description see text. **E**: In the hatched region (i.e., the ventrotemporal quadrant), H1 and H2 are arranged in separate layers. d, dorsal; n, nasal; t, temporal; v, ventral.

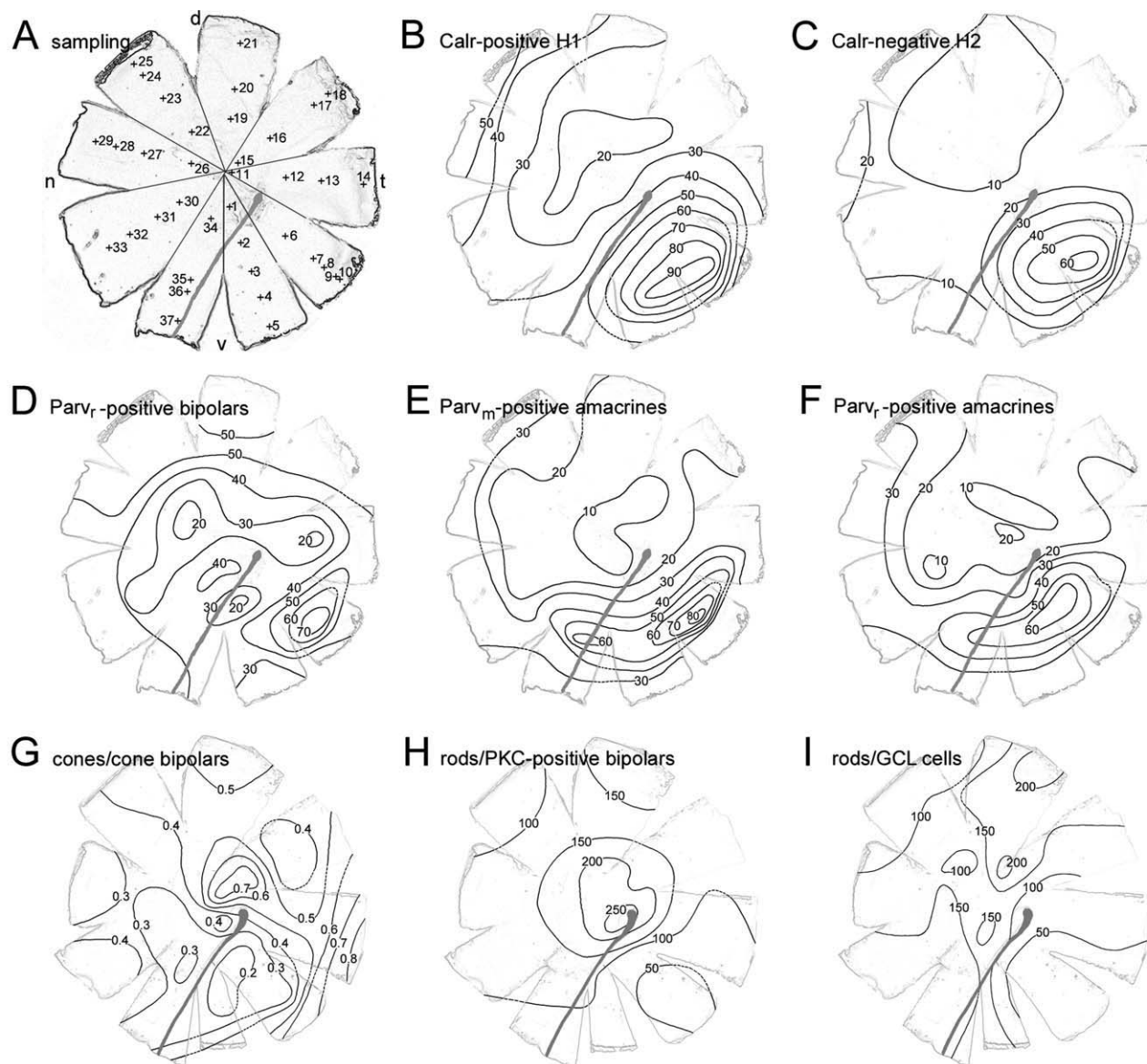


Fig. 4. Topographic isodensity contour maps (**B–F**, cells per $10^4 \mu\text{m}^2$) and correlation maps (**G–I**) of various retinal cell types based on measurements at 37 sampling sites (**A**). Maps are plotted on the original whole mount; however, counts were drawn on the basis of vibratome sections and confocal image stacks. **B,C**: Single-labeling experiment for calretinin to separate horizontal cells H1 and H2. **D–F**: Immunolabeling with rabbit anti-parvalbumin (Parv_r) and mouse anti-parvalbumin (Parv_m). **G–I**: Correlation maps generated on the basis of density distribution maps shown in Figure 3. d, dorsal; n, nasal; t, temporal; v, ventral. For further description see text.

(diameter $4.0\text{--}6.5 \mu\text{m}$) making up the main part of the scleral portion of the INL were assigned to bipolars, whereas the larger spherical or elongated nuclei (diameters $6\text{--}11 \mu\text{m}$) with weaker fluorescence in the vitreal half of the INL were expected to belong to amacrine and Müller cells. Diameters and fluorescence brightness, however, often showed seamless transitions, so the classification of some nuclei remained unclear. This applied particularly to the differentiation of rod/cone bipolars and the separation of Müller cell nuclei.

Outside the ventrotemporal quadrant, the ganglion layer cells are arranged in a monolayer, whereas in the

“cone area” they appear stacked because of a tighter package. The ganglion cell nuclei (as well as displaced amacrine) are spherical or irregular in shape, with rather bright fluorescence and diameters ranging continuously between $5.5 \mu\text{m}$ and $9.0 \mu\text{m}$. A small portion of GCL nuclei should belong to glial cells (e.g., Fig. 2E).

Immunolabeling and Refinement of Cell Type Classification

To attain a more detailed classification of INL cell types and to gain additional data on neuron morphology

in the anchovy retina, immunohistochemical fluorescence labeling in up to three spectral channels was applied. In *E. encrasicolus*, the following immunoreactivities could be observed.

Calretinin immunoreactivity. Anti-calretinin antibodies were linked to different retinal structures from OPL to GCL. Figures 1A and 2A give an overview of the calretinin staining pattern in the European anchovy retina. Calretinin is expressed in horizontal cells, and H1 shows the strongest immunoreactivity in cell bodies, dendrites, axons, and particularly the axon terminals (Figs. 1A,G, 2A). The latter are voluminous structures just at the scleral border of the compact part of the INL. They are considerably larger off the ventrotemporal quadrant (diameter 20–25 μm vs. 9–11 μm in the area temporalis). H2 somata are much more weakly labeled, and neither axons nor axon terminals could be found. Off the area temporalis, the difference in staining intensity between H1 and H2 ceases; no calretinin immunoreactivity could be detected in H3 cells or in all H cells near the retinal margin. H1 cell dendrites terminate in two OPL planes consistent with the levels of short and long cone pedicles (Fig. 1G).

Occasionally, anti-calretinin (raised in rabbits) weakly labeled bipolar cells, identified as cone bipolars because of their dendritic branching pattern and the shape, size, and position of their nuclei (not shown). A scattered subpopulation of amacrine cells with varying degree of fluorescence brightness was found to be immunoreactive for calretinin (Figs. 1A,C, 2A). Associated nuclei are spherical, with several bright, spotty chromocenters, and diameters range from about 5 μm to 7 μm . Figure 1A,C shows a subdivision of the IPL by a median horizon of calretinin-labeled neurite terminals, bisecting the IPL throughout the retina. Near the area temporalis (ventrotemporal quadrant, Fig. 1A), the labeled band is more distinct than off the ventrotemporal quadrant (Fig. 2A), where it appears somewhat blurred occasionally.

Calr immunoreactivity is also present in a subpopulation of GCL cells, although labeling is considerably weaker than in the INL. The somata belonging to irregularly shaped nuclei are calretinin negative.

PKC immunoreactivity. In this study, two types of bipolar cells were found to be immunoreactive for PKC that differ in dendritic tree morphology and position and shape of nuclei and axons, terminating in two distinct layers in the IPL. The first type shows strongly labeled somata with diameters from 6.5 μm to 10 μm depending on the retinal region (Figs. 1B, 2A). Insofar as the radial extent of bipolar cells depends on the retinal thickness, it ranges from 165 μm in the ventrotemporal quadrant (Fig. 1B) to 105 μm in the nasal retina. Evidently, their dendritic arbors are reaching the rod spherules with dendritic fields as small as 15 μm in diameter but much larger off the ventrotemporal quadrant. Axons terminate in spherical varicosities (diameter 5–12 μm) in the vitreal half of the IPL (Figs. 1B,C, 2A). The associated nuclei are large and slightly elongated with pale fluorescence after DAPI staining and are

located at the vitreal border of the scleral half of the compact INL (i.e., more or less between cone bipolars and amacrine cells; Fig. 2D). Mean diameters range from 7.0 μm to 8.4 μm (longitudinal) and from 5.2 μm to 6.0 μm (horizontal cross-section).

The second type of PKC-positive bipolars showed only faint fluorescence labeling, thus it could be seen only in sections with overall high staining intensity (not shown). Because these bipolars exhibit very narrow cytoplasmic spaces around their nuclei resulting from tight packing, their diameters conform roughly to those of the corresponding nuclei (4.0–6.5 μm). Their knob-shaped axon terminals range from 4.5 μm to 6.5 μm in diameter and are located just scleral to those of first type of PKC-positive bipolars.

GFAP immunoreactivity. Immunolabeling of GFAP was found in Müller cells (MCs). It was intense in the vitreal half near their endfeet (stalk region; Fig. 1C) but also ascending in scleral direction to their somata (Fig. 1H). Labeling with anti-glutamine synthetase did not specifically stain Müller cells in *E. encrasicolus* (but see Mack, 2007). Because neuronal somata are ensheathed by MCs, their somata seem to expand over several nuclei, and it is sometimes difficult to assign MC nuclei unequivocally. However, the GFAP-labeled stalks point to elongated and weakly DAPI-stained nuclei with several chromocenters located at the vitreal border of the INL (Fig. 1H).

Parvalbumin immunoreactivity. Immunostaining with anti-parvalbumin antibody (raised in mice; Parv_m) showed the binding pattern specified for higher vertebrates also in a teleost (Fig. 1D). In the vitreal half of the INL, subpopulations of strongly and more weakly labeled amacrine cells were found as well as, occasionally, faintly stained cells in the GCL. The cells of the GCL with irregularly shaped nuclei were Parv_m negative. Parv_m immunoreactivity provides scarce morphological evidence, insofar as labeled neurites arising occasionally from the strongly labeled amacrine somata are very fine and could not be traced far into the IPL. The diameters of the related nuclei range from 5.3 μm to 7.7 μm , depending on the retinal region (small diameters in the ventrotemporal quadrant). Apparently, the neurites terminate in two bands lying close together approximately in the middle of the IPL (Fig. 1D), but also at other IPL levels weak Parv_m immunoreactivity was observed. Simultaneous labeling with rabbit anti-Calr (not depicted) resulted either in a double-labeled scleral band (same as in Fig. 1A) plus an exclusively Parv_m-positive vitreal band or in a broad double labeled horizon in the middle of the IPL. Accordingly, a part of the Parv_m-positive amacrine cells also showed Calr immunoreactivity.

Anti-parvalbumin raised in rabbits (Parv_r) also binds to subpopulations of amacrine cells in the vitreal half of the INL (Fig. 1E), a part of these being identical to the Parv_m-positive amacrine cells as revealed by double-labeling experiments (Figs. 1F, 2B). Again, some of these amacrine cells were also Calr-positive (not shown). Simultaneous labeling with anti-Parv_m showed that Parv_r-positive ama-

TABLE II. Cell Densities and ONL Thickness Drawn From Immunolabeled Vibratome Sections as Shown in Figures 1A–C, 2A (anti-Calr + anti-PKC + anti-GFAP)*

Sampling site in Figure 3A	Rods	ONL (μm)	Cones	H1 + H2	H3	PKC-negative bipolars	PKC-positive bipolars	Calr-negative amacrines	Calr-positive amacrines	Müller cells (GFAP)	GCL cells
1	8,505	58	102	25	8	357	50	169	4	35	65
2	4,246	61	281	103	18	1,637	74	534	21	76	112
3	6,405	56	372	130	25	2,336	66	596	22	125	182
4	5,957	58	361	157	37	2,027	92	618	37	156	133
5	9,207	62	126	37	6	328	41	146	14	18	65
6	8,679	58	126	34	8	279	33	144	19	—	89
7	4,781	50	230	98	7	1,591	67	420	48	46	124
8	1,889	26	541	140	32	2,078	66	630	28	109	227
9	1,798	28	732	171	36	2,807	79	859	30	101	227
10	1,719	32	555	104	21	835	41	541	28	117	125
11	7,294	54	148	39	7	389	27	148	31	31	96
12	7,299	65	261	50	12	500	59	277	15	42	114
13	6,257	58	312	57	10	595	86	377	13	69	85
14	3,128	32	202	42	14	265	31	323	16	74	53
15	7,690	62	201	27	5	264	40	119	9	14	54
16	—	66	205	24	5	267	39	150	13	38	102
17	8,191	62	86	31	5	284	57	76	13	58	71
18	6,606	60	122	38	6	329	61	249	28	80	46
19	7,579	59	158	31	4	273	31	98	9	14	35
20	6,954	56	174	30	11	353	57	170	19	42	42
21	6,156	51	168	42	12	326	35	151	15	48	27
22	6,553	57	119	—	—	309	35	139	13	38	74
23	6,332	52	161	41	9	466	56	132	19	60	52
24	5,906	46	190	46	11	437	64	142	25	52	(37)
25	4,651	43	203	51	12	473	51	176	19	103	81
26	—	65	177	54	5	639	71	158	39	64	(113)
27	8,485	54	106	38	6	423	53	137	9	46	49
28	7,200	56	169	50	15	565	65	318	13	52	68
29	6,413	43	183	67	20	698	59	326	39	53	53
30	—	—	—	—	—	317	46	194	36	31	37
31	8,312	61	99	34	9	371	51	139	26	50	66
32	8,339	61	111	38	12	425	59	201	24	45	47
33	7,203	59	149	45	13	357	59	186	16	42	45
34	8,562	62	90	35	6	329	42	185	27	23	48
35	8,763	65	106	36	5	337	63	140	15	25	47
36	9,026	65	141	37	11	470	61	179	9	69	46
37	7,762	59	124	38	20	451	83	232	33	63	38

*Values are cells per $10^4 \mu\text{m}^2$. Calr, calretinin; GCL, ganglion cell layer; GFAP, glial fibrillary acidic protein; H, horizontal cell; ONL, outer nuclear layer; PKC, protein kinase C.

crines mainly contribute to the vitreal of the two aforementioned horizons of amacrine terminals in the IPL (Fig. 1F), whereas the scleral one traces back to the pure Parv_m-positive amacrines.

In the ventrotemporal quadrant, Parv_r immunoreactivity is also prominent in H1 cells, including their axons and axon terminals (Figs. 1E,F), whereas, in the remainder of the retina, no H cells were labeled (Fig. 2B).

Throughout the retina, numerous labeled cells are present at the scleral border of the INL (near the retinal margin even displaced into the H-cell level), identified as cone bipolars by their flat branching dendrites apparently contacting the synaptic sites of cones (Fig. 1EJ, with auxiliary WGA staining of OPL synaptic sites). The diameters of dendritic fields range from about 12 μm in the ventrotemporal quadrant to about 20 μm in the ventrodorsal quadrant. The nuclei of Parv_r-positive bipolar

cells range from 5.0 μm to 5.7 μm in diameter, so they are larger than most (bipolar) nuclei in the scleral half of the INL (3.8–4.9 μm). The axon terminals of labeled bipolars are aciniform and join the Parv_r-positive band of amacrine terminals vitreally (Fig. 1I). Occasionally, some cells of the GCL with spherical nuclei were faintly labeled. These cells were also weakly Parv_m positive.

Cell Density Distribution

Comparison of local volumes from different retinal positions showed differences in layer thicknesses, neuron densities and ratios, extension of receptive fields, and staining intensity. Data on ONL thickness and density distribution of different retinal cell subpopulations were obtained from 37 sampling sites (Figs. 3A, 4A, Tables II, III). Based on these data, isodensity and isocontour maps

TABLE III. Cell Densities Drawn From Immunolabeled Vibratome Sections as Shown in Figures 1D–G, 2B (anti-Parv_m + anti-Parv_v; anti-Calr)*

Sampling site in Figure 4A	Parv _v -positive bipolars	Parv _m -positive amacrine	Parv _v -positive amacrine	Double-labeled amacrine	Parv _m -positive GCL cells	GCL cells ^a	Percentage Parv _m -positive GCL cells	H1 (Calr positive)	H2 (Calr negative)
1	42	3	10	3	—	—	—	19	15
2	17	28	22	14	—	—	—	50	38
3	47	47	63	41	25	150	16.6	71	52
4	30	57	40	23	17	134	12.7	92	42
5	16	23	23	16	10	57	17.5	84	38
6	36	36	36	26	—	—	—	78	48
7	74	86	53	44	27	291	9.3	90	66
8	78	32	26	26	13	168	7.7	100	58
9	41	27	27	10	14	116	12.1	70	25
10	41	36	21	5	8	61	13.1	65	46
11	28	14	24	14	—	—	—	27	8
12	24	14	10	7	—	—	—	42	15
13	17	23	17	10	—	—	—	36	12
14	40	27	23	13	—	—	—	27	12
15	39	6	3	0	—	—	—	15	12
16	42	6	13	3	—	—	—	15	11
17	55	24	24	14	—	—	—	27	12
18	59	14	14	7	—	—	—	27	20
19	38	16	16	9	—	—	—	27	4
20	52	13	13	6	—	—	—	27	4
21	29	10	13	6	—	—	—	31	8
22	21	12	9	6	—	—	—	15	7
23	57	28	24	19	—	—	—	30	7
24	47	20	30	20	—	—	—	33	11
25	54	37	27	20	10	33	30.3	50	12
26	13	10	13	7	—	—	—	—	—
27	38	16	16	13	6	34	17.6	35	9
28	52	17	24	17	10	45	22.2	35	13
29	50	22	38	13	9	40	22.5	52	21
30	26	19	13	6	—	—	—	18	11
31	30	17	7	7	—	—	—	20	12
32	25	16	22	9	3	34	8.8	28	12
33	47	33	33	17	3	26	11.5	—	—
34	47	16	26	7	12	45	26.7	31	15
35	34	64	54	44	—	—	—	38	12
36	38	38	46	23	8	96	8.3	43	7
37	44	27	27	16	3	19	15.8	—	—

*Values are cells per $10^4 \mu\text{m}^2$. Calr, calretinin; GCL, ganglion cell layer; GFAP, glial fibrillary acidic protein; H, horizontal cell; Parv, parvalbumin.

^aGCL cells counted only on sites with sufficient Parv_m signal.

were generated (Figs. 3B–L, 4B–F), as well as correlative maps after ratio calculations (Fig. 4I–L).

Outer nuclear layer. The numbers of cones and rods both vary considerably in comparing small volumes of the ONL from different retinal positions. A marked cone density maximum was found in the ventrotemporal quadrant (>700 cones/ $10^4 \mu\text{m}^2$; Fig. 3D). This specialized “area ventrotemporalis” is bordered nasally by the optical cleft. A second less steep peak was found at the nasal to dorsonasal periphery, where cone densities reach >200 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$. These two maxima delimit a broad streak of low cone density running from the dorsotemporal to the ventronasal periphery, with lowest values (<100 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$) in the dorsotemporal retina and in the fundus.

Rods show a reverse distribution. In the cone area, values drop to a minimum of fewer than 1,800 rods/ 10^4

μm^2 (Fig. 3C). Rod nuclei account for the major volume fraction of the ONL, so ONL thickness directly mirrors the rod density. Accordingly, the ONL is thinnest in the rod minimum with values below $30 \mu\text{m}$ (Fig. 3B). Rod density maxima are located in the dorsotemporal and the ventronasal retina (about 8,200 and 9,200 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$, respectively), coinciding with maximal ONL thicknesses ($66 \mu\text{m}$ and $65 \mu\text{m}$, respectively). Toward the dorsonasal periphery, both rod density and ONL thickness decline less steeply ($<5,000$ rods/ $10^4 \mu\text{m}^2$ at about $45 \mu\text{m}$).

Inner nuclear layer. The combined density distribution of H1 + H2 cells, as accessible via pure nuclear staining, is mapped in Figure 3E. It is similar in shape to the cone topography, with minimal values in the dorsotemporal and ventronasal periphery

(<30 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$) and maxima in the cone-area (up to 171 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$) and in the nasal periphery (67 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$; Fig. 3E, Table II).

With rabbit anti-calretinin staining, a separation of H1 and H2 was possible (Fig. 4B,C, Table III). Each H-cell type follows the cone topography, with the highest density in the ventrotemporal quadrant (H1: 100 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$; H2: 66 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$) and lowest values in the upper retinal fundus (H1: 15 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$, H2: <10 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$) and toward the dorsal and ventral periphery. A second increase occurs at the nasal periphery (H1: >50 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$; H2: >20 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$). H1 cells outnumber H2 cells throughout the retina with ratios between about 1.5 around the ventrotemporal density peak, 2.0–4.0 over large areas, and up to 6.8 toward the ventral retina. H3 density distribution also follows that of cones (Fig. 3F); maxima occur in the area ventrotemporalis (36 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$) and the nasal periphery (20 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$), and elsewhere values range from 4 to 15 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$.

All second-order neurons of the compact INL combined (i.e., vitreal to the H-cell layer) follow the cone topography (not shown). This is also true for PKC-negative bipolars (determined by nuclear shape, position, and staining pattern) including the weakly PKC-positive bipolars (Fig. 3G). Their density peaks at about 2,800 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$ coinciding with the cone area, drops to values of about 260 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$ in the retinal fundus, and displays a second weaker maximum at the nasal periphery (about 700 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$).

The strongly PKC-positive bipolars, however, show a less regular density distribution (Fig. 3H). Lowest values were found in the fundus (<30 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$), toward the dorsal periphery (35 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$) and, additionally, at the outermost temporal margin (31 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$). Density stays relatively high throughout the ventrotemporal quadrant (>60 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$) and peaks in the temporal (86 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$) and ventral periphery (92 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$). Another streak of higher density extends dorsoventrally in the nasal half of the retina (>60 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$).

In general, the density distribution of parvalbumin_{rabbit}-labeled bipolars follows that of cones (Fig. 4D, Table III). Lowest densities occur in a wide area around the fundus, mostly between 20 and 40 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$. Values increase slightly toward the retinal periphery and reach up to 78 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$ in the ventrotemporal quadrant.

The Müller cells, whose somata and nuclei are also located in the INL, were enumerated via their GFAP-positive stalks at the level of the GCL and IPL (see e.g. Figs. 1C,H; Table II; see also Reichenbach et al., 1991, 1994). Starting from a minimum in the central fundus (14 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$) values increase toward the dorsonasal periphery (>100 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$) and the ventrotemporal quadrant, with a peak of 156 Müller cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$ at the ventral periphery (Fig. 3I).

For determining the number of amacrine, putative amacrine nuclei were counted (large nuclei in the vitreal

half of the INL without PKC-positive bipolars), and the number of Müller cells was subtracted. With values of up to 728 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$ in the ventrotemporal quadrant, a second maximum at the nasal periphery (312 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$), and a broad streak of low density running from dorso-temporal to ventronasal (<200 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$), the topography of amacrine substantially follows that of cones (Fig. 3J, Table II). This is also true for Parv_m- and Parv_r-positive amacrine. Both subpopulations show highest densities in the ventrotemporal quadrant (Parv_m: 86 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$, Parv_r: 68 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$; Fig. 4E,F, Table III), lowest densities in the retinal fundus (both <10 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$), and a moderate increase toward the nasal to dorsonasal periphery (both >30 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$).

The calretinin-positive subpopulation of amacrine, however, shows a slightly deviating, more patchy density distribution (Fig. 3K). Their maximum (48 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$) is located in the ventrotemporal quadrant but slightly shifted compared with the cone maximum. A second peak occurs in the fundus (36 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$), surrounded by the lowest values (<10 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$). Toward the dorsonasal to ventral periphery, values reach >30 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$, whereas in the dorso-temporal periphery values do not exceed 28 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$.

Ganglion cell layer. All nuclei, independently of size and fluorescent brightness (except for few cells obviously belonging to a neuroglial subpopulation; Fig. 2E), were counted as GCL neurons in the triple-labeling experiment (see, e.g., Figs. 1B, 3L), because separation of displaced amacrine (dA) from GC did not succeed with calretinin immunolabeling. Therefore, the calculated densities represent upper limits (Table II). The highest density was observed in the ventrotemporal quadrant (227 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$), coinciding with the cone area (Fig. 3L). Values decrease in a steep gradient to 35 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$ in the fundus, followed by a second, weaker maximum toward the dorsonasal periphery (up to 81 cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$).

The anti-Parv_m-positive cells of the GCL were considered as dAs or a fraction of dAs. The fluorescence was often too faint to be analyzed area-wide, so no mapping of these dA could be realized. However, it is obvious that the percentage of dAs is moderate near the cone area (about 8–10%), but increases toward the ventral periphery (about 15%), with maximal values in the fundus (25%) and the dorsonasal periphery (30%; see Table III).

Correlation Maps

As in every sampling site, all cell types were captured simultaneously by CLSM, in addition to topographic maps, correlative maps could be generated. To display the amacrine topography, some mathematics was used (Fig. 3J; large cell nuclei in the vitreal half of the INL minus nuclei of PKC-positive bipolars minus Müller cells). In Figure 4G–I, selected ratios of pairs of different cell types are mapped to illustrate convergence or divergence. The cones per ganglion cell ratio (dA

subtracted) has a minimum of about 3 in the area temporalis and in the fundus and values of about 6–7 in the dorsonasal periphery (not depicted, but see Fig. 5D in Koch et al., 2010). Cones per putative cone bipolars (PKC-negative bipolars; see Fig. 3G) show a somehow patchy divergence pattern (Fig. 4G), with a minimum in the ventrotemporal quadrant (ratio = 0.2) and maxima in the central and temporal retina (ratio up to 0.8). The rod-to-rod-bipolar convergence map (Fig. 4H) has a maximum in the fundus (250) and a minimum in the cone area (50), and the rod-to-ganglion-cell convergence map shows a similar topography (Fig. 4I).

DISCUSSION

Functional Morphology

The European anchovy is a visually oriented, pelagic, schooling teleost feeding on plankton, either by snapping single particles or by filtering plankton clouds with gill-rakers (Loukashkin and Grant, 1965; Hunter, 1972; Hunter and Dorr, 1982; Whitehead et al., 1988; Chesney, 2008). In the outer retina of *E. encrasicolus*, many aspects of structure–function coupling are evident (e.g., polycones and interference mirrors in the service of polarization-contrast vision; Fineran and Nicol, 1977, 1978; Novales-Flamarique and Harosi, 2002; Heß, 2009; Novales-Flamarique, 2011). In the inner retina as well, various structures stimulate discussion about their functional implications, partially also concerning polarization vision.

The general organization of the anchovy neuroretina follows the common vertebrate ground plan (Dowling, 1987) and shows regional differences in layer thicknesses and cell densities as adaptation to the demands of different sectors of visual space to vision (see, e.g., Collin, 1999). A hallmark of many teleosts is the marked segregation of horizontal cell layers from bipolars by glial fibers (Fig. 1A,J; see Ali and Añtil, 1976), not observed in the retinae of “higher” vertebrates.

The synaptic networking of retinal neurons attaches functional importance to their numerical ratios in a given retinal subvolume. Low convergence stands for high potential visual acuity, high convergence for increased sensitivity, and a high number of interneurons per cone (divergence) argues for complex intraretinal signal processing, e.g., contrast formation. In *E. encrasicolus* the cell densities decrease from photoreceptors via interneurons to ganglion cells, thus constituting the general radial convergence pattern (see, e.g., Sterling et al., 1988). Most cell types follow a common horizontal topographic pattern. It is supposed that neurons with similar topographies most likely belong to the same retinal subnet, and at least within the photopic system a proliferation gradient including all cell layers appears to keep the area of highest visual acuity and most complex intraretinal processing in the ventrotemporal quadrant of the anchovy retina (see also topography of the IPL thickness in Koch et al., 2010).

The concomitant presence of rod and cone nuclei in the ONL of *E. encrasicolus* implies a wide usable range of light intensities through toggling between the cone-driven photopic system during daylight and the rod-driven scotopic system in dim-light periods and/or deep water. The cone topography mirrors the potential visual acuity distribution within the visual space, with a maximum in the upper frontal visual field (gazing at prey, schooling, avoiding predators). This assumption is emphasized by a congruent topography of cone bipolars and ganglion cells, a proof that is often demanded (Hairston et al., 1982; Collin and Pettigrew, 1989; Shand et al., 2000; Dolan and Fernández-Juricic, 2010) but not always realized. The second nasal maximum is significant as well, indicating a second visual attention focus in the rear visual field. Maximal rod density is provided over large areas in the central and ventral retina for dim light vision (see rod convergence below) without a marked peak. The cone topography described here confirms the corresponding findings of O’Connell (1963), Heß et al. (1998), and Heß (2009) from ellipsoid countings. The slightly lower cone peak found by Heß (2009) can be explained by interindividual differences or by missing the exact maximum because of discrete sampling (Fig. 3A; see also Koch et al., 2010; Fig. 1H–J). The rod density minimum in the ventrotemporal quadrant obviously is no “specific” adaptation but should be taken as an inevitable curtailment as a result of the cone area.

Morphological (see also Heß et al., 2002) and immunohistochemical differences reveal at least three types of horizontal cells in the anchovy retina, suggesting functional differences. This assumption is supported by decreasing calretinin immunoreactivity from H1 to H3 (Fig. 1G) and distinctly decreasing cell densities in the same direction (Figs. 3F, 4B,C). The “cone-like” topographies of H cells suggest a place in the photopic system. As for the wiring rules between anchovy H cells and photoreceptors, there is a first indication that H1 cells contact both long and short cones, as in the goldfish (Stell and Lightfoot, 1975; Stell et al., 1975). Peculiar to H1 cells are fine axons leading to a conspicuous layer of axon terminals at the scleral border of bipolar somata (Fig. 1G), a retinal sublayer of the anchovy retina that is obscure as yet. Axon-bearing H1 cells are a common feature of the vertebrate retina (Gallego, 1986; Peichl et al., 1998), with synaptic connection either to the rod spherules (tiger salamander: Zhang et al., 2006; chicken: Edqvist et al., 2008) or to cone bipolar somata (goldfish: Marshak and Dowling, 1987), which obviously also applies to the anchovy.

The PKC-positive bipolar cells make up a distinctive subpopulation, with dendrites reaching the rod spherules and with axon terminals in the ON-layer of the IPL. They are either pure rod bipolars like those of mice (Haverkamp and Wässle, 2000) or instead mixed rod-cone bipolars, as described for different teleost species (Camino et al., 2001; Mack, 2007; Zimov and Yazulla, 2008). Their topography differs from that of most other interneurons. Even though this topography

does not exactly match the rod density distribution, it shows clear reference to the scotopic system, with a marked decline in the cone area.

The majority of unlabeled bipolar cells with cone-like topography (Fig. 3G) should belong to the photopic system. Because the bipolars outnumber the cones by a factor of 2 (fundus) to 5 (area), we can expect a divergent wiring from cones to different bipolar cell types and small bipolar dendritic fields, supporting acute vision within the cone area. Although it is not known how many different bipolar cell types take cover in this population (up to 15 types are described for teleosts: Sherry and Yazulla, 1993; Pignatelli and Marshall, 2010), only few types of narrow-field bipolar are expected to be dominant (similar to cone specific ON- and OFF-midget bipolars in primates; Kolb, 1970). The presence of an equally weighted number of ON- and OFF-bipolars for both cone types appears reasonable to make up the morphological basis for a two-channel contrast mechanism (see, e.g., Nelson et al., 1978; Sakakibara and Mitarai, 1982), although proof is pending.

Calretinin and parvalbumin immunohistochemistry uncovers the topography and IPL termination horizons of a few amacrine subtypes with partially overlapping signatures. The different staining patterns with anti-Parv_r and anti-Parv_m in the anchovy retina could be (at least partially) explained by the different antigen sources, i.e., purified muscle parvalbumin from rat vs. frog (see Table I). From the functional viewpoint, the findings allow only the general conclusion of multiparallel processing within the photopic system (see also Wässle, 2004) and an improved definition of G-cell density by subtraction of putative (Parv_m positive) displaced amacrine from all GCL cells.

A reliable quantification of Müller cells benefits from the strong response of their proximal stalks to GFAP labeling (Humphrey et al., 1993); therefore, these stalks can be used as proxies for the MCs. Reichenbach et al. (1991) state that "... every Muller cell possesses one stout vitread process; thus counts of the stained profiles allow an estimation of their number." In the anchovy retina, the quantification reveals local densities comparable to those of horizontal cells and a topography similar to that of cones and "photopic" interneurons. Being descendants of the same progenitor cell type (Turner and Cepko, 1987), retinal neurons and their ensheathing glia cells obviously follow the same proliferation gradient. This appears reasonable, to maintain their metabolic and insulating functions (Reichenbach and Robinson, 1995). In addition, knowledge of the M-cell density helps in classifying amacrine, the density of which in the vitreal half of the INL is often overestimated.

The cells counted in the GCL are a mixed population of ganglion cells, displaced amacrine, and most probably some glial cells. The percentage of dAs is specified as 10–40% in teleost species (Collin and Pettigrew, 1988a,b), and for *E. encrasicolus* similar values can be deduced from the number of Parv_m-positive cells

(Weruaga et al., 2000; Mack, 2007) in the GCL (8–30%; Table III). Because their fluorescence is often too faint to be analyzed retina-wide, putative dAs could not be mapped. After subtraction of putative dAs, the topographic pattern does not change much, and, from the diminished values for "true" GC, the final grid defining the spatial resolution of cone-vision emerges. Hence, the assumption of highest visual acuity in the upper frontal field of view deduced from cone topography only (Heß, 2009) can be supported circumstantially, and the significance of high-resolution polarization contrast vision in the anchovy for prey detection can be emphasized. To analyze the e-vector direction of a "pixel" in visual space, at least the responses of a short cone and a neighboring long cone have to be set off against each other (analogous to color contrast; see, e.g., Neumeyer, 2003). In this area we now find an overall cone–GC convergence of at least 3–4:1 (see also Koch et al., 2010: Fig. 5D), complying with these requirements. Interestingly, the resemblance between cone and GC topography (compare Fig. 3D and L) results in a rather flat topography, bringing low convergence for the photopic system within and outside the area. With the assumption that *E. encrasicolus* has several types of GCs as in other teleosts (Wheeler, 1982; Ito and Murakami, 1984), the convergence within each parallel GC-driven information channel is even higher on the expense of resolution.

The interpretation of the rod–GC convergence topography is not trivial, in that the rod system is connected "piggyback" to the photopic system (for review see Bloomfield and Dacheux, 2001), and no rod-specific GCs should be present. Without doubt, the convergence (and hence sensitivity) is much greater than in the cone system. Interestingly the rod-to-PKC bipolar ratios barely deviate from the rod–GC ratios (Fig. 4H,I). Given the commonly accepted assumption of a certain rod bipolar-to-GC convergence, not all GCs seem to receive rod input.

Potential and Limits of the Method

Uncertainties in the discrimination of retinal neurons and glial cells, emerging with pure DNA staining and cell classification based on nuclear position and shape only (Koch et al., 2010), could be solved in combination with antibody staining to a great extent. Although only few cell types of the anchovy retina can be marked using fluorescence labeling clearly, differential cell counting and subtraction of subpopulations at least facilitate the classification of INL cells into cone bipolars, rod bipolars, amacrine, and Müller cells. The latter have rarely been considered in quantitative retina studies so far (Gaur et al., 1988; Reichenbach et al., 1991; Gábel et al., 1993; Mack et al., 1998; Mack, 2007) or have simply been pooled with the amacrine (O'Connell 1963).

Outlook

In the future we will strive for a more subtle differentiation of inner retina neurons and display of cell mor-

phologies to refine knowledge of functional retinal architecture in teleosts. In combination with EM-based uncovering of wiring rules, we should get closer to an understanding of the structural basis of color and/or polarization-contrast mechanisms. This study may encourage similar investigation of other vertebrate retinæ or the inner organization of comparable neuronal networks.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank four unknown reviewers for helpful comments to improve the manuscript. The study was supported by a grant of the Deutsche Forschungsgemeinschaft to MH (HE 5428).

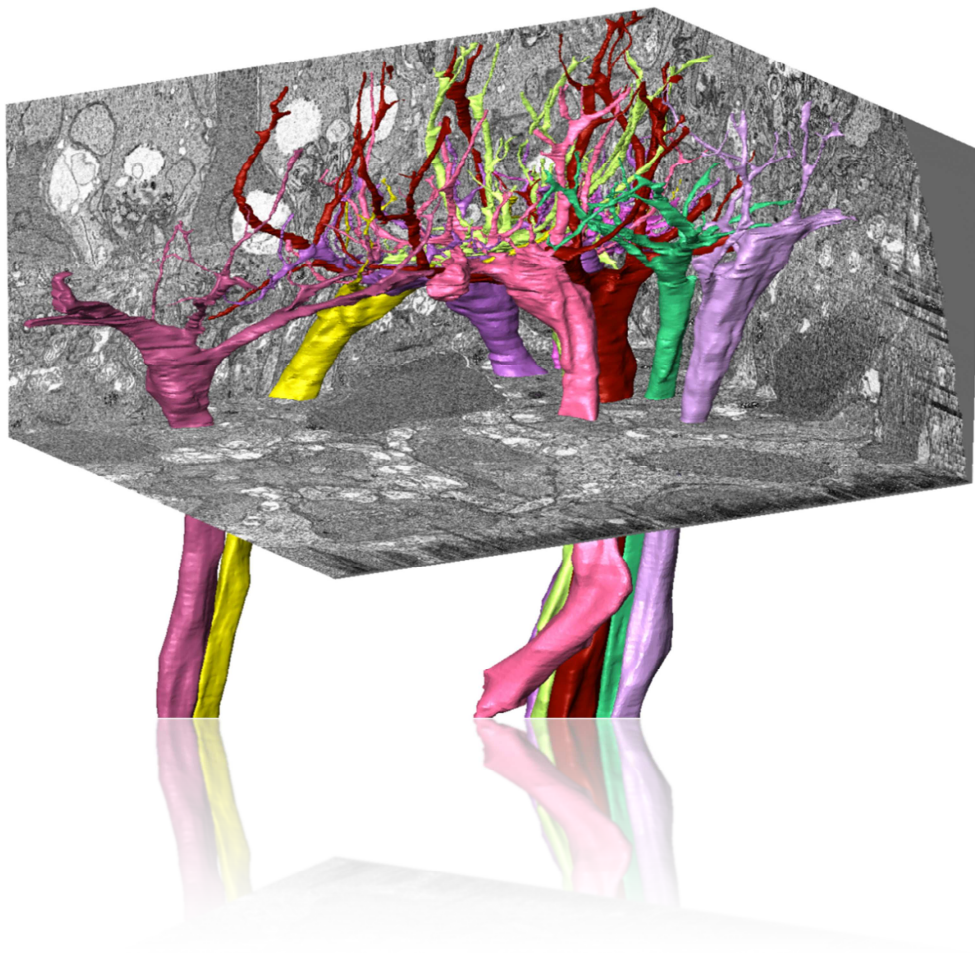
REFERENCES

- Ali MA, Anctil M. 1976. Retinas of fishes—an atlas. Berlin: Springer. 284 p.
- Archer SN, Djamgoz MB, Loew E, Partridge JC, Vallerga S. 1999. Adaptive mechanisms in the ecology of vision. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 680 p.
- Bloomfield SA, Dacheux RF. 2001. Rod vision: pathways and processing in the mammalian retina. *Prog Ret Eye Res* 20:351–384.
- Braekvelt CR, McIntyre DB, Ward FJ. 1989. Development of the retinal tapetum lucidum of the walleye (*Stizostedion vitreum vitreum*). *Histol Histopathol* 4:63–70.
- Caminos E, Velasco A, Jarrín M, Lillo C, Jimeno D, Aijón J, Lara JM. 2001. A comparative study of protein kinase C-like immunoreactive cells in the retina. *Brain Behav Evol* 56:330–339.
- Chesney ES. 2008. Foraging behaviour of bay anchovy larvae, *Anchoa mitchilli*. *J Exp Mar Biol Ecol* 362:117–124.
- Collin SP. 1989. Topographic organization of the ganglion cell layer and intraocular vascularisation in the retinæ of two reef teleosts. *Vis Res* 29:765–775.
- Collin SP. 1999. Behavioural ecology and retinal cell topography. In: Archer SN, Djamgoz MB, Loew E, Partridge JC, Vallerga S, editors. Adaptive mechanisms in the ecology of vision. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. p 509–535.
- Collin SP, Pettigrew JD. 1988a. Retinal topography in reef teleosts I. Some species with well-developed areæ but poorly-developed streaks. *Brain Behav Evol* 31:269–282.
- Collin SP, Pettigrew JD. 1988b. Retinal topography in reef teleosts II. Some species with prominent horizontal streaks and high-density areæ. *Brain Behav Evol* 31:283–295.
- Collin SP, Pettigrew JD. 1989. Quantitative comparison of the limits on visual spatial resolution set by the ganglion cell layer in twelve species of reef teleosts. *Brain Behav Evol* 34:184–192.
- Dolan T, Fernández-Juricic E. 2010. Retinal ganglion cell topography of five species of ground-foraging birds. *Brain Behav Evol* 75:111–121.
- Dowling JE. 1987. The retina: an approachable part of the brain. Cambridge: Belknap Press. 368 p.
- Edqvist PHD, Lek M, Boije H, Lindbäck SM, Hallböök F. 2008. Axon-bearing and axon-less horizontal cell subtypes are generated consecutively during chick retinal development from progenitors that are sensitive to follistatin. *BMC Dev Biol* 8:46.
- Engström K. 1963. Cone types and cone arrangements in teleost retinæ. *Acta Zool* 44:179–243.
- Euler T, Wässle H. 1995. Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina. *J Comp Neurol* 361:461–478.
- Fineran BA, Nicol JAC. 1976. Novel cones in the retina of the anchovy (*Anchoa*). *J Ultrastruct Res* 54:296–303.
- Fineran BA, Nicol JAC. 1977. Studies on the eyes of anchovies *Anchoa mitchilli* and *A. hepsetus* (Engraulidae) with particular reference to the pigment epithelium. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 276:321–350.
- Fineran BA, Nicol JAC. 1978. Studies on the photoreceptors of *Anchoa mitchilli* and *A. hepsetus* (Engraulidae) with particular reference to the cones. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 283:25–60.
- Gábril R, Wilhelm M, Straznicky C. 1993. Morphology and distribution of Müller cells in the retina of the toad *Bufo marinus*. *Cell Tissue Res* 272:183–192.
- Gallego A. 1986. Comparative studies on horizontal cells and a note on microglial cells. *Prog Ret Res* 5:165–206.
- Gaur VP, Eldred W, Sarthy PV. 1988. Distribution of Müller cells in the turtle retina: an immunocytochemical study. *J Neurocytol* 17:683–692.
- Haacke C, Heß M, Melzer RR, Gebhart H, Smola U. 2001. Fine structure and development of the retina of the grenadier anchovy *Coilia nasus* (Engraulidae, Clupeiformes). *J Morphol* 248:41–55.
- Hairston NG, Li KT, Easter SS Jr. 1982. Fish vision and the detection of planktonic prey. *Science* 218:1240–1242.
- Haverkamp S, Wässle H. 2000. Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J Comp Neurol* 424:1–23.
- Heß M. 2000. Vergleichend feinstrukturelle Untersuchungen an der Netzhaut der Europäischen Sardelle *Engraulis encrasicolus* L. (Engraulidae) und den Retinæ anderer Clupeiformes. Dissertation, LMU Munich, faculty of biology. <http://edoc.ub.uni-muenchen.de/40/>.
- Heß M. 2009. Triple cones in the retinæ of three anchovy species: *Engraulis encrasicolus*, *Cetengraulis mysticetus* and *Anchoa macrolepidota* (Engraulidae, Teleostei). *Vis Res* 49:1569–1582.
- Heß M, Melzer RR, Smola U. 1998. Density map and patterns of cone photoreceptors in the retina of the European anchovy *Engraulis encrasicolus* L. (Engraulidae, Clupeiformes). *ZACS* 101(Suppl 1):38.
- Heß M, Melzer RR, Smola U. 2002. The pattern of cone pedicles and horizontal cells in the retina of the European anchovy, *Engraulis encrasicolus* L. (Engraulidae, Clupeiformes). *J Submicrosc Cytol Pathol* 34:355–365.
- Heß M, Melzer RR, Eser R, Smola U. 2006. The structure of anchovy outer retinæ (Engraulidae, Clupeiformes)—a comparative light- and electron-microscopic study using museum-stored material. *J Morphol* 267:1356–1380.
- Hughes A. 1981. Population magnitudes and distribution of the major modal classes of cat retinal ganglion cells as estimated from HRP filling and a systematic survey of the soma diameter spectra for classical neurons. *J Comp Neurol* 197:303–339.
- Humphrey MF, Constable IJ, Chu Y, Wiffen S. 1993. A quantitative study of the lateral spread of Müller cell responses to retinal lesions in the rabbit. *J Comp Neurol* 334:545–558.
- Hunter JR. 1972. Swimming and feeding behavior of larval anchovy, *Engraulis mordax*. *Fish Bull* 70:821–838.
- Hunter JR, Dorr H. 1982. Thresholds for filter feeding in northern anchovy, *Engraulis mordax*. *CalCOFI Rep* 23:198–204.
- Ito H, Murakami T. 1984. Retinal ganglion cells in two teleost species, *Sebastiscus marmoratus* and *Navodon modestus*. *J Comp Neurol* 229:80–96.
- Koch PC, Seebacher C, Heß M. 2010. 3D-topography of cell nuclei in a vertebrate retina—a confocal and two-photon microscopic study. *J Neurosci Methods* 188:127–140.
- Kolb H. 1970. Organization of the outer plexiform layer of the primate retina: electron microscopy of Golgi-impregnated cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 258:261–283.
- Locket NA. 1985. The multibank rod fovea of *Bajacalifornia drakei*, an alepocephalid deep-sea teleost. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 224:7–22.
- Loukashkin AS, Grant N. 1965. Behavior and natural reactions of the northern anchovy, *Engraulis mordax* Girard, under the influence of

- light of different wavelengths and intensities and total darkness. *Proc Calif Acad Sci* 31:631–692.
- Lythgoe JN. 1979. The ecology of vision. Oxford: Clarendon Press. 270 p.
- Mack AF. 2007. Evidence for a columnar organization of cones, Müller cells, and neurons in the retina of a cichlid fish. *Neuroscience* 144:1004–1014.
- Mack AF, Germer A, Janke C, Reichenbach A. 1998. Müller (glial) cells in the teleost retina: consequences of continuous growth. *Glia* 22:306–313.
- Marshak DW, Dowling JE. 1987. Synapses of cone horizontal cell axons in goldfish retina. *J Comp Neurol* 256:430–443.
- Nelson R, Famiglietti EV, Kolb H. 1978. Intracellular staining reveals different levels of stratification for on-center and off-center ganglion cells in the cat retina. *J Neurophysiol* 41:427–483.
- Neumeier C. 2003. Wavelength dependence of visual acuity in goldfish. *J Comp Physiol A* 189:811–821.
- Novalés Flamarique I, Harosi FI. 2002. Visual pigments and dichroism of anchovy cones: a model system for polarization detection. *Vis Neurosci* 19:467–473.
- Novalés Flamarique I, Hawryshyn CW. 1998. Photoreceptor types and their relation to the spectral and polarization sensitivities of clupeid fishes. *J Comp Physiol A* 182:793–803.
- Novalés Flamarique I. 2011. Unique photoreceptor arrangements in a fish with polarized light discrimination. *J Comp Neurol* 519:714–737.
- O'Connell CP. 1963. The structure of the eye of *Sardinops caerulea*, *Engraulis mordax*, and four other pelagic marine teleosts. *J Morphol* 113:287–329.
- Peichl L, Sandmann D, Boycott BB. 1998. Comparative anatomy and function of mammalian horizontal cells. In: Chalupa LM, Finlay BL, editors. Development and organization of the retina from molecules to function, vol 299. New York: Plenum Press. p 147–172.
- Pignatelli V, Marshall J. 2010. Morphological characterization of retinal bipolar cells in the marine teleost *Rhinecanthus aculeatus*. *J Comp Neurol* 518:3117–3127.
- Reckel F, Melzer RR, Smola U. 2001. Outer retinal fine structure of the garfish *Belone belone* (L.) (Belonidae, Teleostei) during light and dark adaptation—photoreceptors, cone patterns and densities. *Acta Zool* 82:89–105.
- Reckel G, Melzer RR. 2003. Regional variations in the outer retina of Atherinomorpha (Teleostei): photoreceptors, cone patterns and cone densities. *J Morphol* 257:270–288.
- Reichenbach A, Robinson SR. 1995. The involvement of Müller cells in the outer retina. In: Djamgoz MBA, Archer SN, Vallerger S, editors. Neurobiology and clinical aspects of the outer retina. London: Chapman & Hall. p 395–416.
- Reichenbach A, Schnitzer J, Friedrich A, Knothe A-K, Henke A. 1991. Development of the rabbit retina: II. Müller cells. *J Comp Neurol* 311:33–44.
- Reichenbach A, Ziegert M, Schnitzer J, Pritz-Hohmeier S, Schaaf P, Schober W, Schneider H. 1994. Development of the rabbit retina. V. The question of “columnar units.” *Brain Res Dev Brain Res* 79:72–84.
- Sakakibara M, Mitarai G. 1982. Chromatic properties of bipolar cells in the carp retina. *Color Res Appl* 7:178–181.
- Shand J, Chin SM, Harman AM, Moore S, Collin SP. 2000. Variability in the location of the retinal ganglion cell area centralis is correlated with ontogenetic changes in feeding behavior in the black bream, *Acanthopagrus butcheri* (Sparidae, Teleostei). *Brain Behav Evol* 55:176–190.
- Sherry DM, Yazulla S. 1993. Goldfish bipolar cells and axon terminal patterns: a Golgi study. *J Comp Neurol* 329:188–200.
- Somiya H, Takei S, Mitani I. 2000. Guanine and its retinal distribution in the tapetum of the bigeye tuna, *Thunnus obesus*. *Ichthyol Res* 47:367–372.
- Stell WK, Lightfoot DO. 1975. Color-specific interconnections of cones and horizontal cells in the retina of the goldfish. *J Comp Neurol* 159:473–502.
- Stell WK, Lightfoot DO, Wheeler TG, Leeper HF. 1975. Goldfish retina: functional polarization of cone horizontal cell dendrites and synapses. *Science* 190:989–990.
- Sterling P, Freed MA, Smith RG. 1988. Architecture of rod and cone circuits to the on-beta ganglion cell. *J Neurosci* 8:623–642.
- Turner D, Cepko C. 1987. A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* 328:131–136.
- Wässle H. 2004. Parallel processing in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci* 5:747–757.
- Wässle H, Dacey DM, Haun T, Haverkamp S, Grünert U, Boycott BB. 2000. The mosaic of horizontal cells in the macaque monkey retina: with a comment on biplexiform ganglion cells. *Vis Neurosci* 17:591–608.
- Weruaga E, Velasco A, Briñón JG, Arévalo R, Aijón J, Alonso JR. 2000. Distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin D-28k and calretinin in the retina of two teleosts. *J Chem Neuroanat* 19:1–15.
- Wheeler TG. 1982. Color vision and retinal chromatic information processing in teleost: a review. *Brain Res Rev* 4:177–235.
- Whitehead PJP, Nelson GJ, Wongratana T. 1988. Clupeoid fishes of the world (suborder Clupeoidei). Part 2—Engraulidae. *FAO Species catalogue*. Vol 7. FAO fisheries synopsis 125. Rome: FAO Publications Division. 303 p.
- Zhang AJ, Zhang J, Wu SM. 2006. Electrical coupling, receptive fields, and relative rod/cone inputs of horizontal cells in the tiger salamander retina. *J Comp Neurol* 499:422–431.
- Zhang J, Yang Z, Wu SM. 2004. Immunocytochemical analysis of spatial organization of photoreceptors and amacrine and ganglion cells in the tiger salamander retina. *Vis Neurosci* 21:157–166.
- Zimov S, Yazulla S. 2008. Novel processes invaginate the pre-synaptic terminal of retinal bipolar cells. *Cell Tissue Res* 333:1–16.
- Zueva LV. 1980. Retinal cones of the black sea anchovy *Engraulis encrasicolus*—an analyzer of polarized light in vertebrates. *Zhur Evol Biokhim Fiziol* 17:602–605.

3.4 3D-Ultrastruktur des retinalen Nervennetzes bei *Engraulis encrasicolus*

Petra C. Koch, Gerhard Wanner, Martin Heß (Manuskript in Vorbereitung)



Einleitung

Eine grundsätzliche Eigenschaft der Vertebratenretina ist – wie der Name „Retina“ (= **Netzhaut**) ausdrückt – die Verflechtung von Interneuronen mit Photorezeptoren und Ganglienzellen, sowie dieser Zelltypen miteinander, in zwei strukturell sehr komplexen (plexiformen) Schichten. Hier bilden die verschiedenen Neuronentypen unzählige synaptische Kontakte aus, deren spezifische Verschaltungsregeln und \pm regelhafte geometrische Eigenschaften in radialer und horizontaler Richtung nur mit speziellen Färbe- und Schneidemethoden (teilweise) entschlüsselt und dargestellt werden können.

Die Untersuchung der Neuroanatomie und Konnektivität von Retinaneuronen wurde klassischerweise mit Golgi-Imprägnierung (Ramón y Cajal, 1892; Kolb et al., 1992; Wagner & Wagner, 1988; Ahnelt & Kolb, 1994a; Linberg et al., 1996; Boycott & Wässle, 1991; MacNeil et al., 1999; Famiglietti, 2008), oftmals in Verbindung mit Ultradünnschnitten und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM: Downing & Djamgoz, 1989; Kolb, 1970; Kolb & Nelson, 1984; Hidaka et al., 1986; Ahnelt & Kolb, 1994b) durchgeführt. Diese stochastische Methode bietet jedoch keine gezielte Färbung bestimmter Neuronen. Reproduzierbare Ergebnisse bieten Immunhistochemie (Haverkamp & Wässle, 2000; Wässle et al., 2009; Koch & Heß, 2011) oder sog. „DiOlistic techniques“, bei denen lipophile Tracer zum Einsatz kommen (Gan et al., 2000; Connaughton et al., 2004; Song et al., 2008). Nichtsdestotrotz können meist nur einzelne Zellen oder Zellpopulationen in lichtmikroskopischer Auflösung dargestellt werden, benachbarte Zellen, sowie deren Kontakte zueinander bleiben „unsichtbar“.

Um die strukturelle Basis der Retina als Bildverarbeitungsrechner und einige artspezifische Besonderheiten (z.B. Sehschärfe, Lichtempfindlichkeit, Kontrastmechanismen, Parallelprozessierung) zu verstehen, müssen die Morphologien aller beteiligten Neuronentypen, deren rezeptive Felder, Zellzahlverhältnisse und Stratifizierungsmuster, sowie die Selektivität und Geometrie neuronaler Konnektivität in der äußeren und inneren plexiformen Schicht hoch aufgelöst und dreidimensional analysiert werden. Ultradünnschnittserien können die Basis für dreidimensionale Rekonstruktionen einzelner Zellen oder Zellabschnitte bilden (Cohen & Sterling, 1990; Kolb & Dekorver, 1991; Strettoi et al., 1990), eine Eignung dieser Methode für großräumigere Rekonstruktionen wurde in dieser Studie geprüft und durch methodische Erweiterungen des Standardprozedere (z.B. elastische Registrierung der Stapelbilder) verbessert. Die technisch-methodischen Grenzen dreidimensionaler Rekonstruktion anhand von Ultradünnschnittserien konnten durch die erstmals hier vorgestellte Methode der FIB-FESEM (focused ion beam field emission scanning electron microscopy) größtenteils überwunden und ein frei bewegliches, hoch aufgelöstes 3D-Modell des neuronalen Netzwerkes der ungefärbten (!) Sardellenretina eines bestimmten Probevolumens generiert werden.

Jedes Retinaneuron gehört zu einem qualitativ distinkten Typ mit morphologischen, physiologischen, chemischen und synaptischen Eigenschaften (Sterling, 1982, 1983;

Rodieck & Brening, 1983). Eine morphologische Klassifizierung von Retinazellen ist sinnvoll, da z.B. Bipolaren unterschiedlicher Morphotypen selektive Kontakte zu Photorezeptoren und ihre Dendriten unterschiedliche Arten von Synapsen ausbilden und somit ihre Funktion determiniert ist (Stell, 1967; Kaneko, 1973; Stell et al., 1977; Saito et al., 1978).

Im folgenden Kapitel wurde ein Probevolumen (VOI, *volume of interest*) des ventro-temporalen Quadranten untersucht, da in diesem Bereich die höchste Zelldichte und die kleinsten dendritischen Felder zu erwarten sind (Area temporalis).

Material und Methoden

Bezugsquelle der Sardellen

Für ultrastrukturelle Untersuchungen neuronalen Gewebes ist es zwingend notwendig, lebendfrisch fixiertes Material zu bekommen. Die Retinae mussten daher direkt nach dem Fang lebendfrisch noch auf dem Schiff fixiert werden. Diese Möglichkeit bot sich mit Fischern aus Koper (Slowenien), die mit der in Piran ansässigen Meeresbiologischen Station der Universität Ljubljana (NIB: National Institute of Biology) zusammenarbeiten.

Bei der nächtlichen Ausfahrt wurde auch hier der Sardellenschwarm durch starkes Licht angelockt (Abb. 3.4.1 A) und mit einer Ringwade, die um den Schwarm geschlossen wurde, gefangen (Abb. 3.4.1 B).

Die an Bord gehobenen Fische (u.a. Sardellen, Makrelen, Goldstriemen) wurden lebend in große Behälter mit Eis überführt (Abb. 3.4.1 C) und die Sardellen konnten von uns direkt entnommen werden. Die Augenbecher wurden sofort präpariert (Abb. 3.4.1 D) und in 2,5% Glutardialdehyd (in PB; für FIB-FESEM mit 1% Tannin) für einige Stunden fixiert und danach in Phosphatpuffer mit Natriumazid aufbewahrt.

3D-Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

(1) Rekonstruktion einer Ultradünnschnittserie

Eine dreidimensionale Rekonstruktion der neuronalen Elemente in der OPL mit Amira[®] erfolgte an einer kurzen, radial geführten Ultradünnschnittserie (82 Schnitte; 3 × 3 Pedicles), die bereits zu einem früheren Zeitpunkt angefertigt wurde (Heß, 2000). Dies gelang lediglich für voluminöse Strukturen (Abb. 3.4.2 A, B), da die Schnitte beim Schneidevorgang und im Elektronenstrahl deformiert werden (Abb. 3.4.2 D) und es zu Verzerrungen durch die elektromagnetischen Linsen der Elektronenoptik kommt (Abb. 3.4.2 E). Dies führt zu großen „Sprüngen“ zwischen benachbarten Schnitten und macht ein Verfolgen feinerer Dendriten im Kabelgewirr der OPL unmöglich.

(2) Entzerrung einer Ultradünnschnittserie

Ein glutaraldehydfixiertes Retinafragment des ventro-temporalen Quadranten wurde zunächst mit 1% OsO_4 (in 0,1 M Phosphatpuffer) für 2 h auf Eis nachfixiert und in einer aufsteigenden Acetonreihe entwässert. Nach der Einbettung in Epon-Kunstharz (Komponenten siehe Tab. 3.1.1; Polymerisierung bei 60°C, 48 h) wurde mit einem Leica EM UC6 Mikrotom eine lückenlose Ultradünnschnittserie (50–70 nm, 300 Radialschnitte) angefertigt, die in etwa 8×4 Zapfenpedicles beinhaltet.

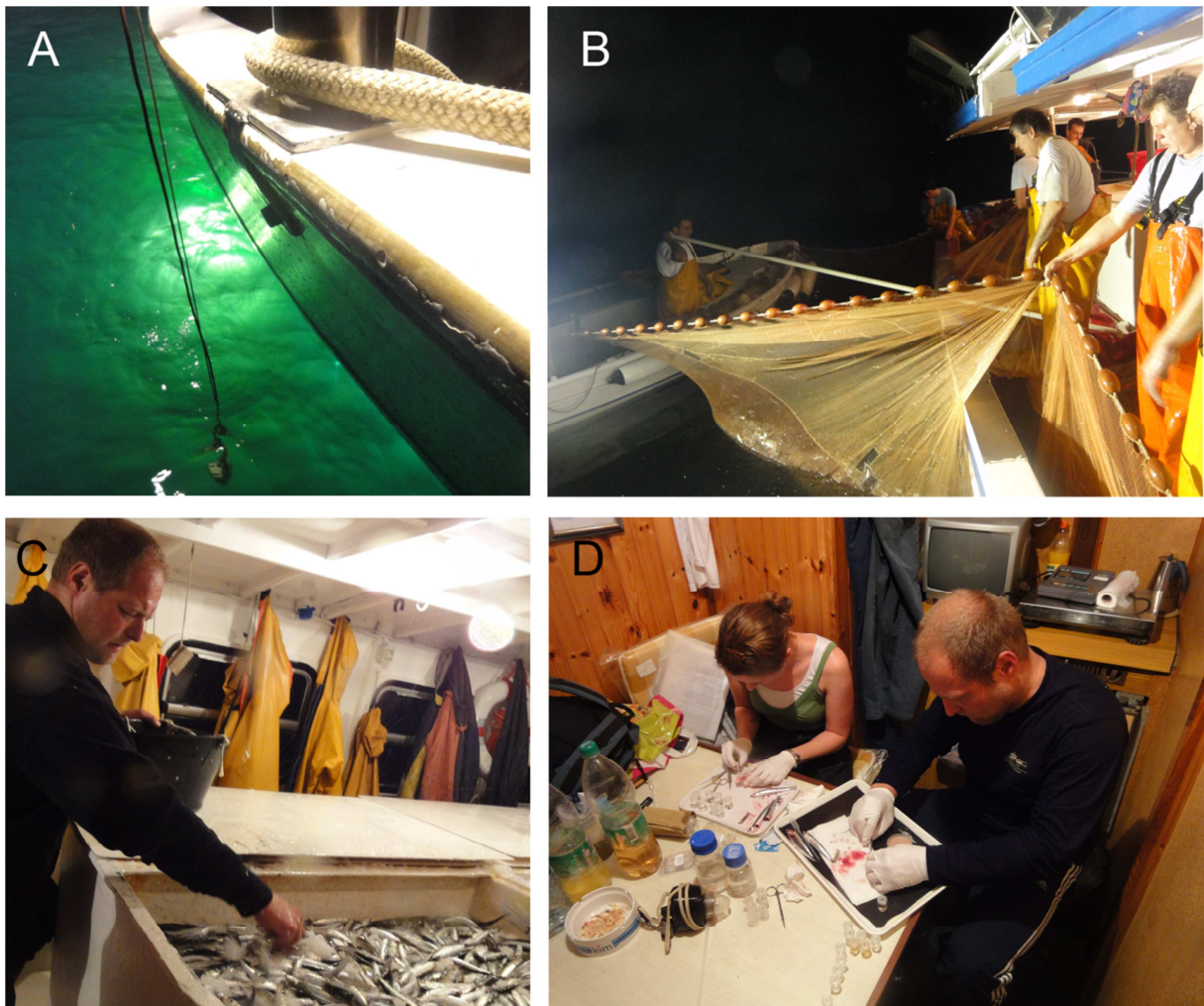


Abb. 3.4.1 Ringwadenfischerei in Slowenien und lebendfrische Fixierung der Sardellen an Bord.

A Um positiv phototaktisches Plankton anzulocken, wird die Wasseroberfläche rund um das Fischerboot mit starken Scheinwerfern beleuchtet. **B** Mit Hilfe eines kleineren Beibootes (stationär, einzige Lichtquelle kurz vor Ende des Fangvorgangs) wird die Ringwade um den Fischschwarm herum geschlossen. **C** Die lebenden Fische werden sortiert und in Container mit Eis überführt. **D** Die Sardellen konnten an Bord dekapitiert und lebendfrisch fixiert werden.

Anschließend wurden die Schnitte in gesättigten Lösungen der Schwermetallsalze Uranylacetat (8 min, 40°C) und Bleicitrat (5 min, RT) kontrastiert und mit vollentsalztem Wasser gewaschen. Die digitale Fotografie der äußeren plexiformen Schicht (OPL) erfolgte entweder mit einer Megaview 3-Digitalkamera (Soft Imaging Systems) am FEI Morgagni 268 (80 kV, Vergrößerung 18.000×) oder mit einer Gatan Orius-Digitalkamera (Digital Micrograph) an einem JEOL JEM-1230 TEM (80 kV, Vergrößerung 15.000×). Um eine Bildauflösung von 3–4 nm/pixel zu gewährleisten, waren mit der FEI-Kamera (1376 × 1032 px) 26–30 Bilder pro Schnitt notwendig (Abb. 3.4.2 C), wohingegen bei der Gatan-Kamera mit weit größerem Bildausschnitt (3840 × 2490 px) nur 3–5 Bilder pro Schnitt notwendig waren. Das „Stitching“ der Einzelbilder zu einem zusammengesetzten Bild gelang mit Adobe® Bridge® CS und Photoshop® CS weitestgehend automatisch, wenn notwendig, wurden Korrekturen manuell durchgeführt. Da ein präzises Alignment und dadurch eine Verfolgung von Dendriten kaum möglich war, wurde versucht, eine Entzerrung der Schnittbilder mit dem ImageJ-basierten Bildbearbeitungsprogramm Fiji (Plugin bUnwarpJ) durchzuführen (Abb. 3.4.2 F). Hierzu wurde zunächst ein grobes Vor-Alignment in Amira® durchgeführt. Anschließend wurde der gesamte Bilderstapel auf einen Ausschnitt von 4 × 3 Pedicles reduziert, um die Datenmenge deutlich zu verkleinern. Für die Entzerrung mussten manuell auf zwei benachbarten Schnittbildern sog. „landmarks“ (d.h. Stellen, die auf beiden Schnitten an der exakt gleichen Stelle gelegen sind) gefunden und gesetzt werden. Die Entzerrung gelang besser, je dichter die landmarks gesetzt wurden (50–60 pro Schnittpaar), mit besonderem Augenmerk auf die synaptischen Zonen der Pedicles. Diese Methode stellte sich als stark fehlerbehaftet und zu zeitaufwändig heraus. Zudem waren sowohl Soft- als auch Hardware für die ursprüngliche Serie von 300 hochaufgelösten, großflächigen Bildern nicht ausgelegt und somit wurde diese Methode nicht weiter verfolgt.

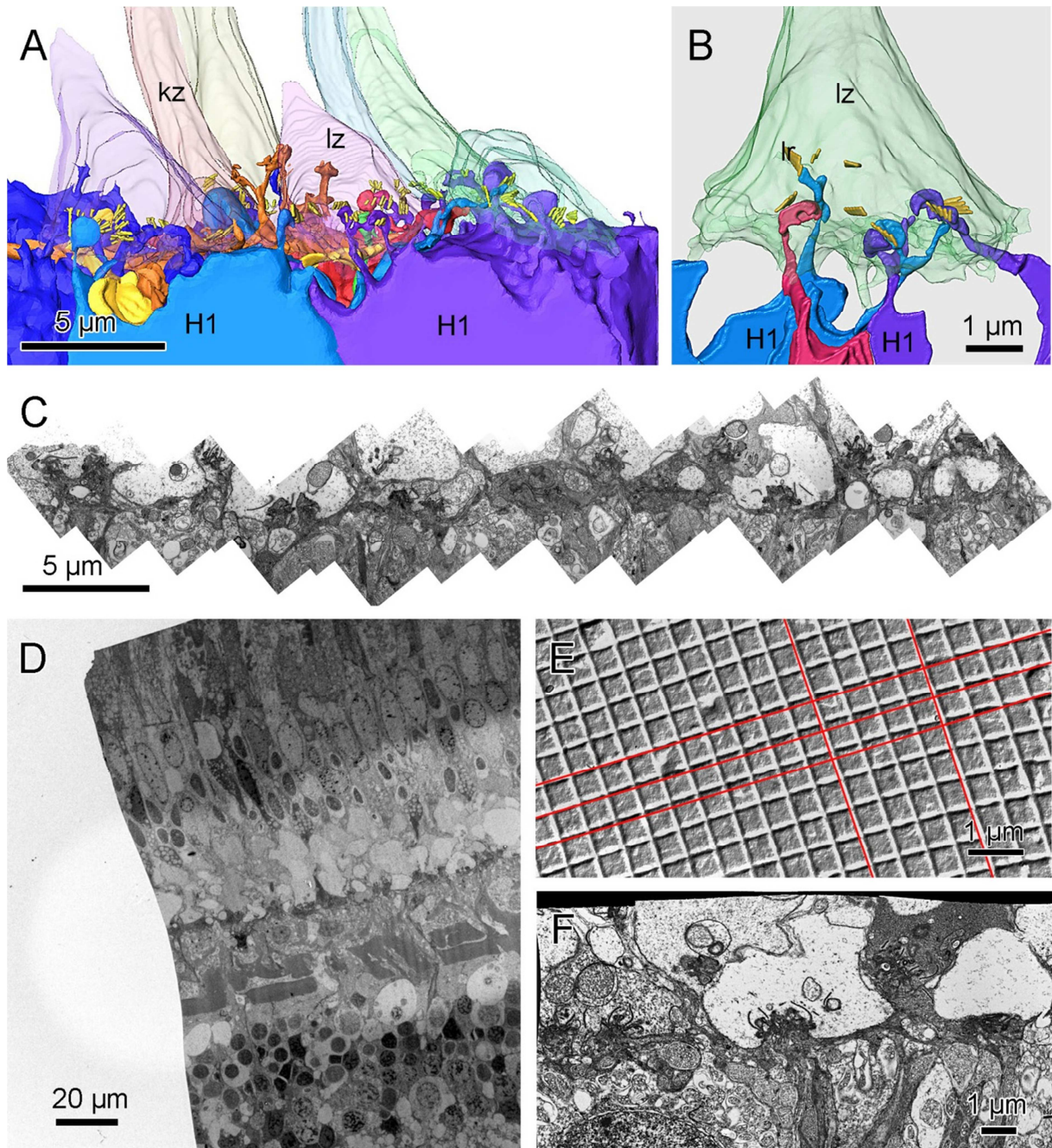


Abb. 3.4.2 Auf einer Ultradünnschnittserie beruhende 3D-Rekonstruktion der OPL (Amira®; A, B), sowie Probleme und Methodenoptimierung bei Ultradünnschnittserien (C–F).

H1 (Horizontalzelle 1), kz (kurzer Zapfen), lr (Ribbon eines langen Zapfens), lz (langer Zapfen).

A Auf einer radial geführten Ultradünnschnittserie beruhende 3D-Rekonstruktion der OPL. Aufgrund der Verzerrungen und des daraus resultierenden schlechten Alignments der Einzelbilder konnten nur „große“ Strukturen wie Horizontalzellen 1 (H1) samt Dendriten, kurze (kz) und lange Zapfen (lz) verfolgt und rekonstruiert werden. **B** Auf einer tangential geführten Ultradünnschnittserie beruhende 3D-Rekonstruktion eines langen Zapfens (lz) mit synaptischen Ribbons (lr) und kontaktierenden H1-Dendriten. Man beachte die „stufige“ Oberfläche der Strukturen, die aus schlechtem Alignment und vergleichsweise dicken Schnitten (80 nm) resultiert. **C** Aus 30 Einzelbildern zusammengesetzte TEM-Aufnahme der OPL (Megaview3-Kamera des FEI Morgagni). **D** Durch den Elektronenstrahl verzerrter Ultradünnschnitt nach einer TEM-Session. **E** TEM-Aufnahme eines „grated grid“. Zur Verdeutlichung der Abbildungsfehler durch magnetische Linsen wurden entlang des gebogen erscheinenden Gitternetzes rote, gerade Linien eingezeichnet. **F** TEM-Schnittbild nach der Entzerrung mit Fiji. Man beachte die durch die Entzerrung entstandenen gebogenen Ränder des Schnittbildes.

3D-EM basierend auf FIB-FESEM

(Focused Ion Beam Field Emission Scanning Electron Microscopy)

Wegen der genannten Schwierigkeiten der nachträglichen Entzerrung von TEM-Schnittbildern, sollten *per se* unverzernte, gut alignierte Schnittbilder generiert werden. Trotz mehrmonatiger Vorlaufzeit konnte für die Nutzung des sog. Heidelberger Hobels (*serial-block-face electron microscopy*) am Friedrich-Miescher-Institut (FMI) in Basel, kein Termin gefunden werden. Eine weitere, gute Möglichkeit bot sich ab September 2010 durch die Nutzung der Auriga®-CrossBeam® Workstation (Zeiss) der AG Wanner im Hause.

Das „Auriga“, per Definition ein FIB-FESEM (focused ion beam field emission scanning electron microscope), liefert durch Abtragung einer definierten Schicht der Epon-Oberfläche mit einem (Gallium-)Ionenstrahl und *block-face*-Fotografie ungestörte, gut alignierte Schnittbilder in nahezu TEM-Qualität.

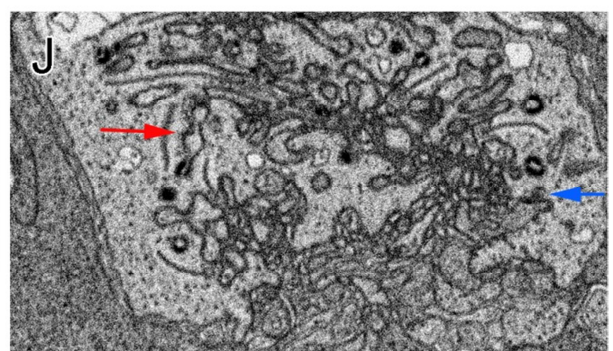
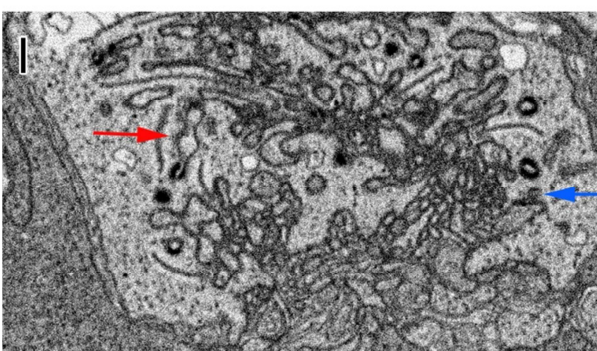
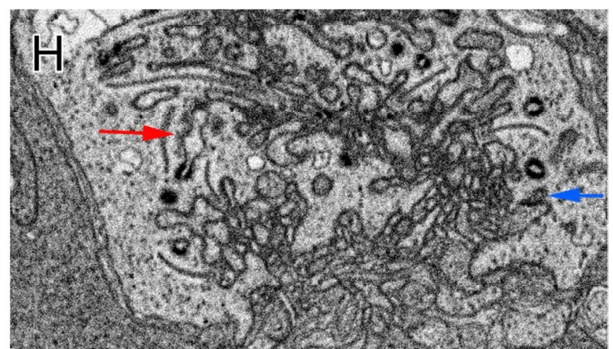
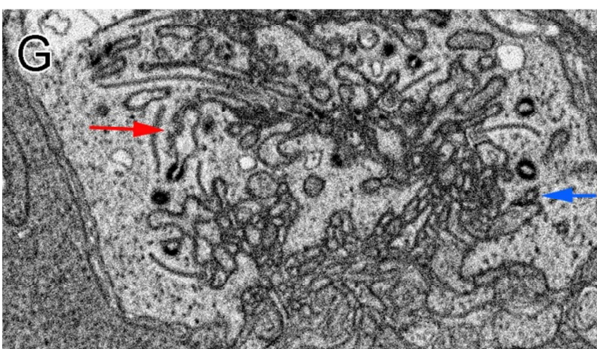
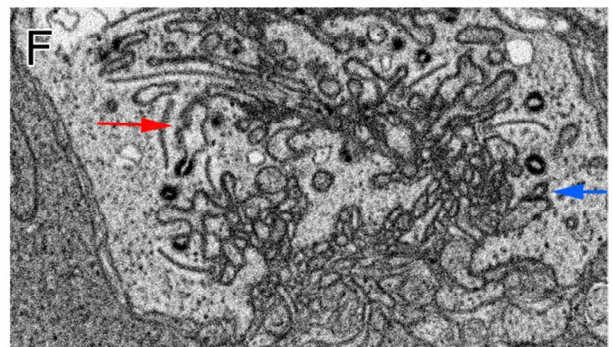
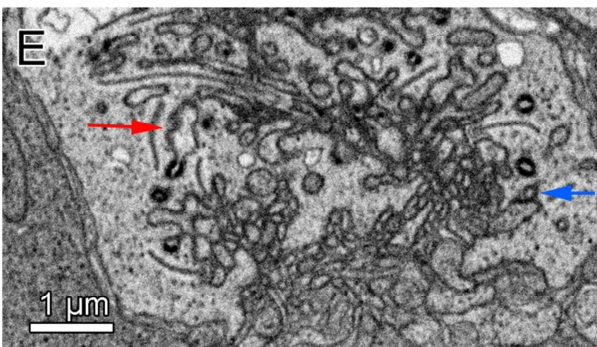
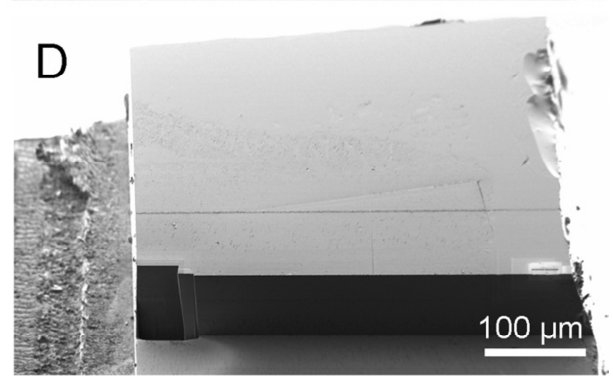
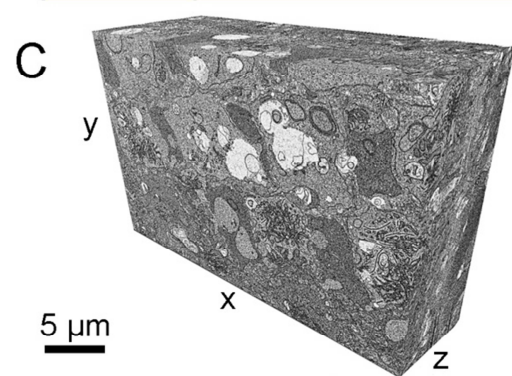
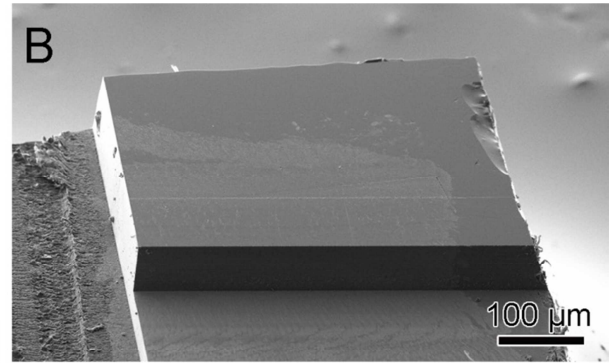
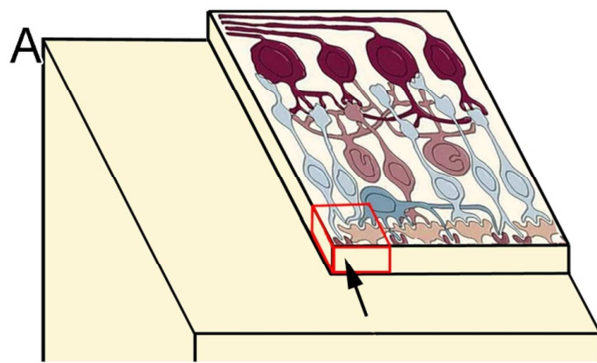
Die Proben für das FIB-FESEM wurden wie folgt vorbereitet:

Nach der Osmierung (1% OsO₄ in 0,1 M Cacodylatpuffer, 2 h auf Eis) eines glutaraldehydfixierten Retinafragmentes des ventro-temporalen Quadranten folgte die Uranylisierung *en bloc*, d.h. das gesamte Retinafragment wurde mit 1%iger Uranylacetatlösung behandelt (1 h, 40°C). Das Retinafragment wurde in einer aufsteigenden Acetonreihe entwässert und in Epon-Kunstharz (Komponenten s. Tab. 3.1.1) eingebettet. Die Polymerisierung des Kunstharzes erfolgte in zwei Schritten: nach der üblichen Polymerisierung bei 60°C für 48 h folgte ein weiterer Härtungsschritt bei 100°C für 2 d.

Der Eponblock wurde mit einer Rasierklinge grob vorgetrimmt und in etwa in die endgültige Form gebracht. Nachdem die Probe auf einen speziellen Halter mit einem Tropfen Epon durch anschließendes Auspolymerisieren geklebt wurde, konnte sie mit Glasmesseranten zur Mesa fein getrimmt werden (Abb. 3.4.3 A, B, D). Um die Probe für das FIB-FESEM leitfähig zu machen, wurde sie mit Kohlenstoff bedampft (Balzers High Vacuum Evaporator BAE 121, Liechtenstein; Schichtdicke 15 nm, gemessen mit einem BalTec QSG 100 Quartz Film Thickness Monitor).

Abb. 3.4.3 Für das FIB-FESEM zur „Mesa“ getrimmte Retinaprobe (Epon; A–C) und kleine Auswahl der daraus entstandenen Bilderreihe (E–J). ►

A Schemazeichnung der Mesa mit Lage der Retinaneuronen im Präparat (nicht maßstabsgetreu!). Der **Pfeil** zeigt die „Schneiderichtung“ am FIB-FESEM an. Der rot umrandete Bereich markiert das Volumen des ersten Bilderstapels (siehe C). **B** Rückstreuelektronenaufnahme der Mesa vor dem ersten Scan. **C** 3D-Bilderstapel des fehlenden Volumens der Mesa aus D. Man beachte die scharfen xz- und yz-Projektionen dank des guten Alignments. **D** Rückstreuelektronenaufnahme der Mesa nach dem ersten Scan. **E–J** Kurze Bildserie des Datenvolumens aus C auf Höhe eines langen Zapfen-Pedicles mit einer Auflösung von $9 \times 9 \times 10 \text{ (nm}^3\text{)}$. Man beachte die geringe aber deutlich sichtbare Strukturveränderung von Schnitt zu Schnitt (Pfeile deuten jeweils auf dieselbe Stelle).



In der Auriga[®]-CrossBeam[®] Workstation werden mittels eines Gallium-Ionenstrahls feine Schichten der Probe abgetragen und die neu entstehende Oberfläche des Probenblocks per REM im Rückstreuelektronenkontrast abgebildet.

Folgende Arbeitsschritte waren hierfür notwendig (vereinfacht):

- Probe ausrichten
- Ggf. Deposition einer Platinschicht (ca. 500 nm) auf der Probenoberfläche (für Bereiche mit besonders geringem Schichtabstand, für ein gleichmäßiges Abtragen mit unversehrter Probenoberkante).
- Auswahl der Schneide- und Abbildungsfenster, wobei das Schneidefenster größer als das Abbildungsfenster ist. Es können nicht zwei angrenzende Aufnahmen der Oberfläche gemacht werden, um das Abbildungsfenster zu erweitern. Das Schneidefenster wurde auf $50 \times 30 \mu\text{m}$ eingestellt, die Größe des Abbildungsfensters war $27,86 \mu\text{m} \times 20,89 \mu\text{m}$ (s. Tab. 3.4.1).
- Einstellen der Parameter für Gallium-Ionenstrahl und Elektronenstrahl.
- „Anschnitten“ der Probenvorderfläche mit dem Ionenstrahl, um eine glatte und perfekt senkrechte Blockoberfläche zu erhalten und das System „einzufahren“.
- Abwechselnd Schicht abtragen und Blockfläche via Rückstreuelektronen abbilden (s. Tabelle 3.4.1; Zeitaufwand ca. 3–4 min/Bild).

Es wurden insgesamt knapp $144 \mu\text{m}$ mit – abhängig von den Durchmessern der zu verfolgenden Strukturen – wechselnden x-, y- und z-Auflösungen „geschnitten“, was nahezu der gesamten Neuroretina entspricht (von OPL bis GCL). Dies geschah aus mehreren Gründen in mehreren Ansätzen (Logistik, Gerätekonfiguration, Nachtrimmen der Seitenwände des Schneidegrabens zur Vermeidung von „Schattenwurf“), was zu neun aufeinanderfolgenden Datenvolumina führte (s. Tab. 3.4.1). Dieses „Anstückeln“ brachte Probleme wie Verlust von Schnittebenen zwischen den Datenstapeln und nicht 100%ige Überlappung sukzessiver Schneidefenster mit sich. Ebenfalls ergaben sich aus verschiedenen komplexen technischen Gründen ein Auswandern des Schneidefensters und zeitweilige Bildunschärfen im Datenstapel, die sich teilweise über mehr als 100 Bilder hinweg erstreckten („out-of-focus“ durch nicht exaktes Abtragen).

Aufgrund der teilweise enormen Größe der einzelnen Datenstapel ($>8 \text{ GB}$; s. Tab. 3.4.1) erfolgte die dreidimensionale Rekonstruktion der neuronalen Elemente mit der 3D-Rendering Software Amira[®] zunächst via Remote-Zugang am Linux Cluster des Leibnitz Rechenzentrums München (Sun x4600 Server mit acht quad-core Opteron Prozessoren, 256 GB RAM; Nvidia Quadro FX 5800 Grafikkarte). Später konnte die Rekonstruktion am lokalen Fujitsu Celsius R670-2 Rechner (32 GB RAM, Intel Xeon Prozessor 2,93 GHz, Nvidia Quadro 2000 Grafikkarte) mit Hilfe eines Wacom Interactive Pen Displays DTF-720 weitergeführt werden.

Für die Rekonstruktion wurden die Bilder der einzelnen Stapel in Adobe Photoshop® für Amira® vorbereitet (Graustufen, Autokontrast, Unschärf maskieren, Vergrößerung der Arbeitsflächen). Durch die leichte Schiefelage des Scans und das dadurch bedingte Auswandern des Schneidefensters mussten die Arbeitsflächen der Einzelbilder vergrößert werden: so konnte ein Auswandern des eigentlichen Bildes aus dem 3D-Datenfenster nach Alignment vermieden werden.

Dies führte zu noch größeren Datenmengen, die Soft- und Hardware an ihre Grenzen brachten, was erhebliche Verzögerungen im Zeitablauf nach sich zog. Die Verfolgung (mehrmaliges Hin- und Herfahren im Datenstapel, um Anschnitte feiner Dendriten korrekt zuzuweisen) und manuelle Segmentierung (fast) aller neuronalen Elemente in der OPL nahm ca. 6 Monate in Anspruch (bei ca. 7–8 h täglichem Segmentieren), die Datenstapel der INL bis GCL konnten in weiteren 3 Monaten bearbeitet werden.

Die resultierenden 3D-Modelle der einzelnen Datenstapel konnten mittels Transform Editor so aneinandergefügt werden, dass ein Gesamtmodell der Retina von OPL bis GCL entsteht (z.B. Abb. 3.4.12 A).

Tabelle 3.4.1 Umfang und Auflösung der einzelnen Bilderstapel, die am FIB-FESEM generiert wurden.

Schicht	Anzahl Einzelbilder (Datengröße)	Bildauflösung [px × px]	Auflösung [nm × nm × nm]	Dicke [µm]
OPL + INL1	1250 (8,25 GB)	3072 × 2304	9,068 × 9,068 × 10	12,5
INL2	260 (908 MB)	2048 × 1536	13,6 × 13,6 × 50	13,0
INL3	356 (1,04 GB)	2048 × 1536	13,6 × 13,6 × 50	17,8
INL4	270 (815 MB)	2048 × 1536	13,6 × 13,6 × 50	13,5
INL5	241 (727 MB)	2048 × 1536	13,6 × 13,6 × 50	12,1
IPL1	664 (1,95 GB)	2048 × 1536	13,6 × 13,6 × 25	16,6
IPL2	1214 (3,58 GB)	2048 × 1536	13,6 × 13,6 × 25	30,4
IPL3	472 (1,39 GB)	2048 × 1536	13,6 × 13,6 × 25	11,8
IPL4 + GCL	648 (1,91 GB)	2048 × 1536	13,6 × 13,6 × 25	16,2
Summe	5375 (20,64 GB)			143,9

Ergebnisse

Photorezeptor-Terminalen

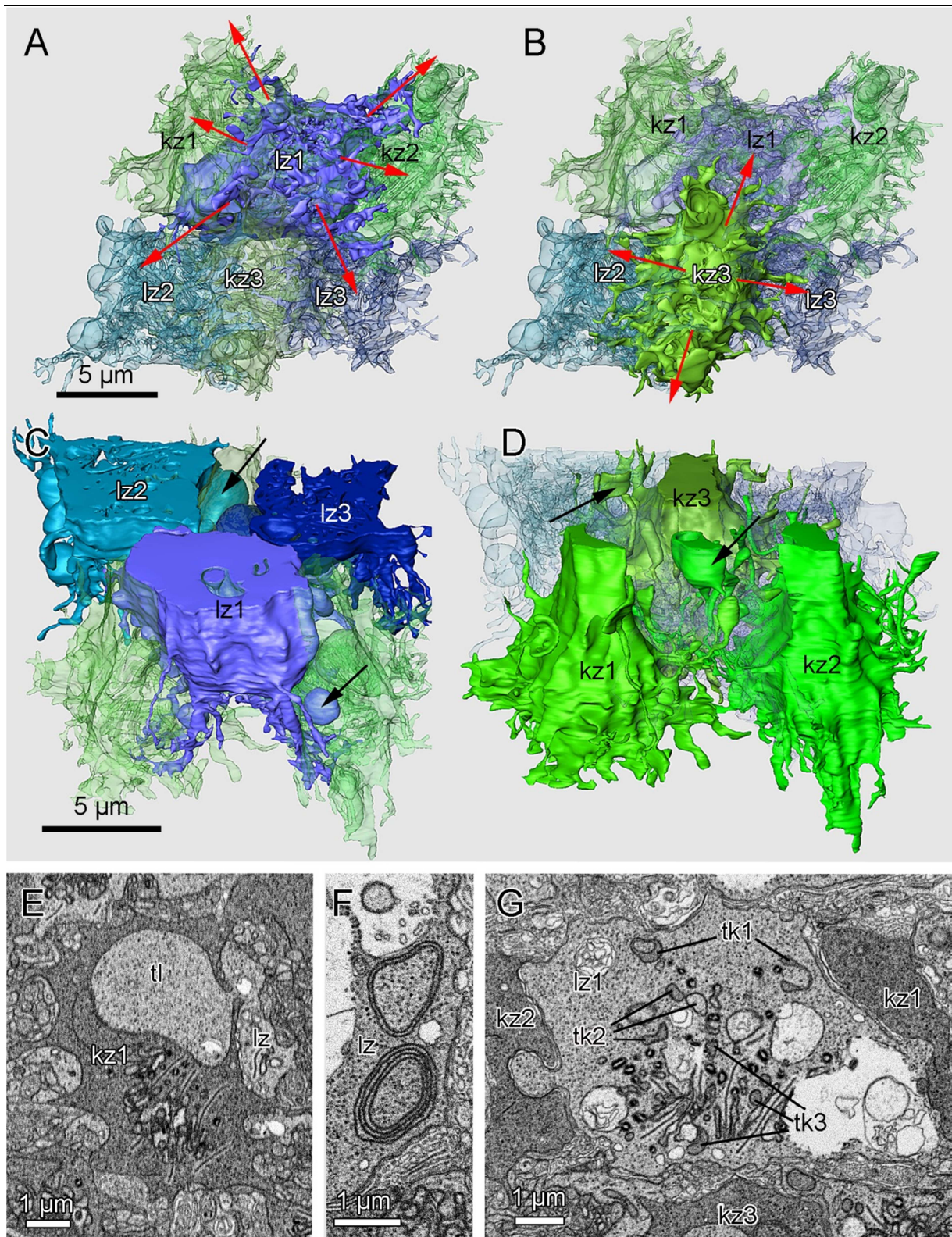
Im untersuchten Volumen befinden sich insgesamt 28 synaptische Terminalen von Zapfen (Pedicles), jeweils 14 von kurzen und langen Zapfen, wovon sechs vollständig enthalten sind (jeweils drei von kurzen und langen Zapfen, s. Abb. 3.4.4). Die restlichen 22 Pedicles befinden sich nur teilweise im Volumen. Zwischen den Pedicles sind im Volumen 25 Stäbchen-terminalen (Spherules) zu finden, wovon 14 mit Kontakt zu im Volumen liegenden Sekundärneuronen rekonstruiert wurden.

Die Pedicles weisen eine \pm rechteckige Grundfläche auf, und verjüngen sich pyramidal nach skleral (Abb. 3.4.4 C, D). Die kurzen Zapfen terminieren in der Area temporalis ca. 2 μ m weiter vitreal als die langen Zapfen, was besonders in der dreidimensionalen Rekonstruktion ihrer synaptischen Bänder (Ribbons) deutlich wird (vgl. Abb. 3.4.6 D–F). Im elektronenmikroskopischen Bild erscheinen die Pedicles der kurzen Zapfen elektronendichter als die der langen Zapfen (Abb. 3.4.4 E, G). Pro Pedicle sind 16–18 bandförmige, oft gebogene synaptische Bänder (Ribbons) zu finden, deren Länge zwischen 1,9 μ m und 3,5 μ m schwankt (mittlere Länge 2,6 μ m). Die Anordnung scheint zufällig (Abb. 3.4.9), die Pedicles der langen Zapfen zeigen jedoch bei radialer Ansicht zwei Invaginationszentren in Form zweier Höhlungen (Kavitäten) mit Ribbons, in die die Dendriten der Sekundärneuronen münden. Die Zapfen stehen über Fortsätze, die sog. Telodendriten, in engem Kontakt zueinander. Dabei werden Kontakte innerhalb eines Zapfentypes oder zwischen den beiden Zapfentypen eines Polycones oder benachbarter Polyconereihen hergestellt. Ein **langer Zapfen** sendet Telodendriten zu den vier diagonal angrenzenden langen Zapfen der benachbarten Poly-

Abb. 3.4.4 Dreidimensional rekonstruierte Pedicles der Zapfen (Amira[®]), sowie tangential Schnittbilder der Pedicles (FIB-FESEM). ►

lz 1–3 (Pedicles der langen Zapfen, blau), **kz 1–3** (Pedicles der kurzen Zapfen, grün), **tk** (Telodendrit eines kurzen Zapfens), **tl** (Telodendrit eines langen Zapfens); die Verlaufsrichtung der Polycones ist horizontal.

A Vitreale Ansicht der Zapfenpedicles (bis auf lz1 transparent dargestellt). Der lange Zapfen 1 (**lz1**) bildet Fortsätze zu den vier angrenzenden langen Zapfen benachbarter Polycones und den zwei benachbarten kurzen Zapfen desselben Polycones aus (**rote Pfeile**). **B** Der kurze Zapfen 3 bildet Fortsätze zu den vier angrenzenden langen Zapfen desselben und der benachbarten Polycones aus (**rote Pfeile**). **C** Ansicht der Pedicles der langen Zapfen von schräg oben (Pedicles der kurzen Zapfen transparent). Die langen Zapfen invaginieren in die benachbarten kurzen Zapfen desselben Polycones mit großen aufgeschwollenen, runden Strukturen (**Pfeile**). **D** Ansicht der Pedicles der kurzen Zapfen von schräg oben (Pedicles der langen Zapfen transparent). Die kurzen Zapfen bilden Fortsätze zu den benachbarten langen Zapfen aus, die weit in diese invaginieren und sich teilweise an ihrem Ende aufweiten (**Pfeile**).



E Tangentialschnitt durch den kurzen Zapfen 1 (**kz1**) an der skleralen Seite der synaptischen Zone. Ein benachbarter langer Zapfen (**lz**) bildet einen voluminösen Telodendriten (**tl**), der tief in den Pedicle des kurzen Zapfens invaginiert. **F** Membranfaltensysteme, verursacht durch Selbstinvagination eines langen Zapfens. **G** Tangentialschnitt durch den langen Zapfen 1 (**lz1**) skleral der synaptischen Zone. Die Telodendriten der angrenzenden kurzen Zapfen 1–3 (**tk1–3**) dringen tief in den Pedicle des langen Zapfens ein, weiten sich an ihren Enden auf und werden ihrerseits vom Cytoplasma des langen Zapfens invaginiert (siehe **tk1**).

cones aus (Abb. 3.4.4 A). Dabei ziehen die Telodendriten mit den Dendriten anderer Sekundärneuronen zunächst in die synaptische Kavität, passieren jedoch die Ribbons und enden ohne erkennbare synaptische Zone meist mit einer Aufschwellung im Cytoplasma des Pedicles. Mit einer voluminösen und horizontal in den Pedicle dringenden Ausstülpung nimmt ein langer Pedicle zu den beiden angrenzenden kurzen Zapfen desselben Polycones Kontakt auf (Abb. 3.4.4 C, E). Im elektronenmikroskopischen Tangentialschnitt sind im kurzen Zapfen dadurch sehr voluminöse, abgeschnürte cytoplasmatische Räume des angrenzenden langen Zapfens zu beobachten, die einen Großteil des Volumens des kurzen Pedicles einnehmen können (Abb. 3.4.4 E). Ein langer Zapfen kontaktiert somit sechs benachbarte Zapfen beider Typen.

Die **kurzen Zapfen** stehen über Telodendriten mit den angrenzenden vier langen Zapfen desselben bzw. des benachbarten Polycones in Kontakt (Abb. 3.4.4 B), wobei diese Telodendriten ebenfalls an den Ribbons vorbeiziehen und sich im Raum skleral der synaptischen Zone aufweiten (Abb. 3.4.4 D).

Jeder lange Zapfen sendet somit Telodendriten an die vier benachbarten langen Zapfen und die zwei benachbarten kurzen Zapfen desselben Polycones aus und empfängt gleichzeitig Telodendriten von den vier benachbarten kurzen Zapfen, so dass ein Kontakt mit allen acht Zapfen der direkten Nachbarschaft besteht. Die kurzen Zapfen stehen nur mit den vier angrenzenden langen Zapfen über Telodendriten in Kontakt, nicht aber mit anderen kurzen Zapfen. Intrapediculär sind Membranfaltensysteme erkennbar, die – zumindest teilweise – durch die beschriebenen Invaginationen der Telodendriten benachbarter Pedicles entstehen (Abb. 3.4.4 E–G). Telodendriten der angrenzenden kurzen Zapfen dringen von vitreal in die Pedicles der langen Zapfen ein, werden an ihren Enden voluminöser und ihrerseits skleral vom Cytoplasma des langen Zapfens invaginiert (Abb. 3.4.4 G). Dadurch entsteht im tangentialen Anschnitt das Bild von abgeschlossenen Membransäckchen.

Membranfaltensysteme, die sich im Tangentialschnitt als bis zu vier konzentrische Kreise aus Membranen darstellen (Abb. 3.4.4 F), kommen bei beiden Zapfentypen durch **Selbst-invagination** der Pedicles zustande. Dabei zieht ein Telodendrit, der den Zapfen in vitrealer Richtung verlässt, nach einer Biegung in den cytoplasmatischen Raum desselben Pedicles zurück, weitet sich auf, und wird erneut – teilweise mehrmals – vom Cytoplasma des Pedicles invaginiert.

Die **Stäbchenterminalen** (Spherules) sind \pm rund bis oval und reihen sich traubenartig skleral der Pedicles auf. Sie besitzen jeweils nur ein synaptisches Band mit einer Länge von 1,5 μm (vgl. Abb. 3.4.6 D–F; Abb. 3.4.10 F).

Horizontalzellen

Die Form aller drei Horizontalzelltypen ist sternförmig stark gelappt (stellat), wobei der Horizontalzelltyp 3, der in das Müllerband eingebettet ist, am stärksten zerklüftet erscheint (Abb. 3.4.5). Der radiale Versatz der Kernmittelpunkte beträgt im gegebenen Area-Volumen für H1–H2 3,6 μm , für H2–H3 7,5 μm . Die Horizontalzellen desselben Typs stehen über Gap-Junctions in engem Kontakt und bilden somit ein elektrisches Syncytium (Abb. 3.4.5 A).

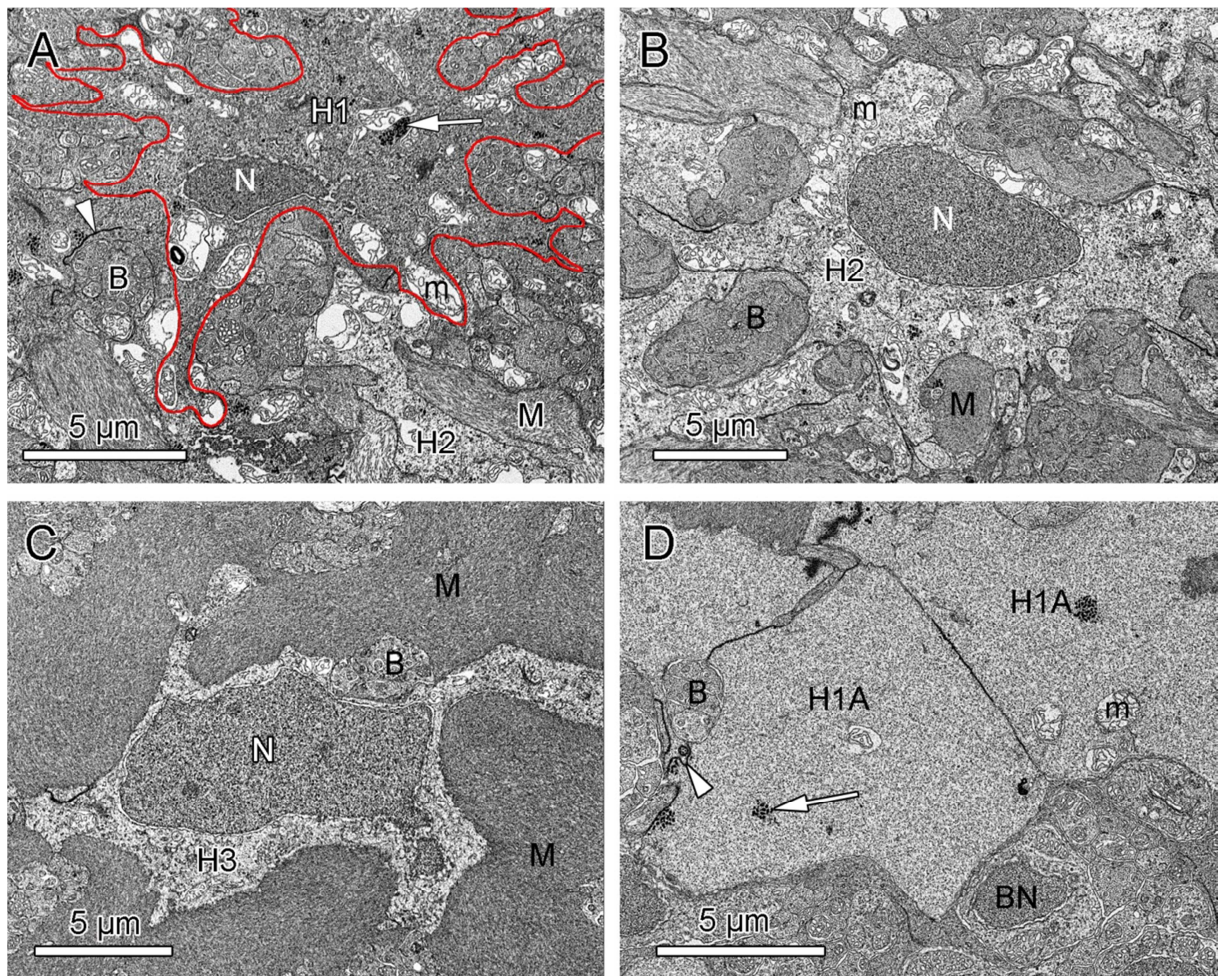


Abb. 3.4.5 Elektronenmikroskopische Tangentialschnitte der Horizontalzelltypen (FIB-FESEM).

B (Bipolardendritenbündel), **BN** (Bipolarnukleus), **H1–3** (Horizontalzellen 1–3), **H1A** (Axonterminale der H1), **m** (Mitochondrium), **M** (Müllerzelle bzw. -band), **N** (Nukleus der jeweiligen Horizontalzelle).

A Horizontalzelltyp 1 (**rot** umrandet) mit stark gelapptem Soma. Im Cytoplasma aller Horizontalzelltypen befinden sich elektronendichte Ansammlungen von Granula (Nematosomata, **Pfeil**). Benachbarte Zellen bilden Gap-Junctions aus, an denen sich membranassoziierte elektronendichte Partikel befinden (**Pfeilspitze**). **B** Horizontalzelltyp 2 mit stark gelapptem Soma und relativ elektronenlichtem Cytoplasma (vgl. H1 in A). **C** Horizontalzelltyp 3, der in das dichte Müllerband (**M**) eingebettet ist. **D** Die Axone der H1 terminieren in voluminösen Strukturen (**H1A**) am skleralen Rand der INL *sensu stricto*, die ebenfalls Nematosomata enthalten (**Pfeil**). Diese Axonterminalen bilden Gap-Junctions zu ihren Nachbarn aus (**Pfeilspitze**).

Durch ihre gelappte Form bleiben im Netz der Horizontalzellen Zwischenräume frei, durch die die Dendritenbündel von tiefer liegenden Horizontalzellen und Bipolaren zur OPL ziehen. Die Zellhaften sind im elektronenmikroskopischen Bild als sehr elektronendichte Bereiche mit membranassoziierten Partikeln zu erkennen (Abb. 3.4.5 A). Weitere Grüppchen elektronendichter Granula sind im Cytoplasma aller Horizontalzelltypen zu finden, am häufigsten jedoch in den H1-Zellen samt Axonterminalen („Nemosomata“: Abb. 3.4.5 A, D; vgl. Heß, 2000). Die zahlreichen Mitochondrien sind teilweise artifiziell aufgeschwollen, und haben eine Länge von bis zu 2,5 µm und eine Breite von ca. 1,5 µm (Abb. 3.4.5). Im untersuchten Retinavolumen konnte jeweils ein Kern jeden H-Zelltyps vollständig rekonstruiert und morphometrisch ausgewertet werden (Tab. 3.4.2). Wie durch die histologischen Untersuchungen vermutet (Manuskript 3.1, in Vorbereitung), zeigen die H3-Kerne die größte Flächenausdehnung und auch das größte Volumen, während die H1-Kerne die kleinsten unter den Horizontalkernen sind.

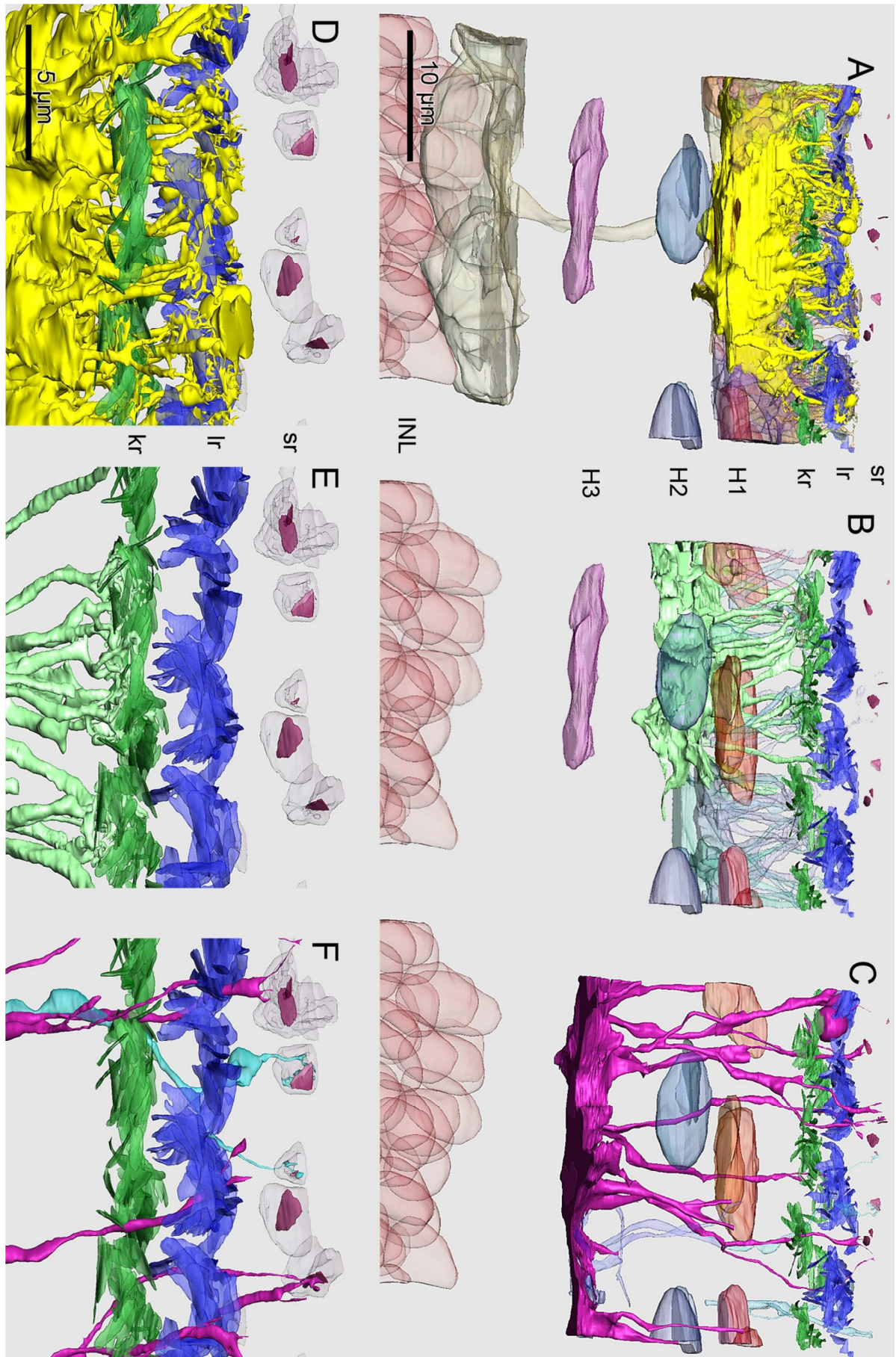
Tabelle 3.4.2 Morphometrische Daten der Horizontalzellkerne nach 3D-Rekonstruktion (Amira®).

Horizontalzelltyp	Horizontale Ausdehnung [µm]	Radiale Ausdehnung [µm]	Volumen [µm ³]
H1	10,0 × 3,5	2,5	98,05
H2	10,1 × 4,3	3,8	112,59
H3	15,8 × 5,1	2,1	116,92

Abb. 3.4.6 Dreidimensional rekonstruierte Horizontalzellen 1–3 (Amira®) in radialer Ansicht. ►

A–C Jeweils eine Zelle jeden Typs ist massiv, die restlichen rekonstruierten Zellen des Zelltyps sind transparent dargestellt. **H1–3** (Horizontalzelltypen 1–3: H1 gelb, H2 türkis, H3 magenta), **INL** (innere Körnerschicht), **kr** (Ribbons der kurzen Zapfen, grün), **lr** (Ribbons der langen Zapfen, blau), **sr** (Ribbons der Stäbchen).

A Der am weitetesten skleral gelegene Horizontalzelltyp 1 mit Axon und Axonterminalen (transparent; gehören nicht zur massiv dargestellten Zelle), die direkt an die Kerne der Bipolaren angrenzen. **B** Der mittig gelegene Horizontalzelltyp 2. **C** Der am weitesten vitreal gelegene und in das dichte Müllerband eingebettete Horizontalzelltyp 3. **D** Detailansicht der synaptischen Zone einer H1 in der OPL. Die Dendriten nehmen Kontakt zu den Ribbons der langen und kurzen Zapfen auf. **E** Detailansicht der synaptischen Zone einer H2 in der OPL. Die Dendriten kontaktieren nur die Ribbons der kurzen Zapfen. **F** Detailansicht der synaptischen Zone von zwei H3-Zellen in der OPL. Die Dendriten kontaktieren die Stäbchen-Ribbons.



Über Größe und Volumen der einzelnen H-Zellen kann keine Aussage gemacht werden, da keine Zelle vollständig im Probenvolumen enthalten ist. Jedoch wird deutlich, dass die Fläche der Somata und auch der dendritischen Felder von H1 nach H3 zunimmt (Abb. 3.4.6 A–C; vgl. auch Heß et al., 2002). Die H1 zeichnen sich – vermutlich – durch ein jeweils vitread verlaufendes Axon aus (Durchmesser ca. 1,2 μm ; Länge >37,4 μm), das in einer voluminösen Axonterminale direkt skleral der Bipolarnuklei endet (Durchmesser $\geq 15 \mu\text{m}$; Abb. 3.4.5 D; Abb. 3.4.6 A).

Eine technisch bedingte Störung im Datenstapel verhindert die 100%ige Zuordnung der Axone zu ihren Somata. Aus den Terminalen entspringen lateral horizontale Fortsätze, die, aufgrund der genannten Störungen zwischen sukzessiven Bilderstapeln, nicht weiter verfolgt werden konnten. Es scheint allerdings wahrscheinlich, dass diese Fortsätze das Axon darstellen, das nicht geradlinig in das sklerale Ende der Terminalen mündet, sondern über eine Schlinge von lateral. Die Terminalen enthalten deutlich elektronenlichteres Cytoplasma als die Somata der H1-Zellen. Diese über Gap-Junctions in Kontakt stehenden Terminalen sind nahezu flächendeckend, es gibt jedoch Zwischenräume, durch die Bipolardendriten gebündelt treten (Abb. 3.4.5 D). Axone sind bei den beiden anderen H-Zelltypen nicht vorhanden bzw. nicht aufzufinden.

Die H1-Zellen zeigen die höchste Primärdendritendichte (vgl. Abb. 3.4.6): mit 150 Primärdendriten/1.000 μm^2 Retinafläche liegen sie deutlich vor den H2-Zellen (65 Dendriten/1.000 μm^2) und den H3 mit nur 27 Dendriten/1.000 μm^2 . Die Dendriten aller H-Zelltypen schmiegen sich lateral an die synaptischen Ribbons der Zapfenpedicles, die sie kontaktieren, und bilden dabei zahlreiche noppige Verzweigungen („spinules“) aus (Abb. 3.4.10 E, G). Die postsynaptische Membran der H-Zellen an den Spinules erscheint verdickt und elektronendicht (Abb. 3.4.10 F, H). Jeder Ribbon eines Pedicles ist somit beidseitig auf einem Teil oder seiner gesamten Länge von den genoppten H-Zelldendriten flankiert. Die H-Zelltypen kontaktieren photorezeptorspezifisch, d.h. jeder H-Zelltyp zeigt ein spezifisches Konnektivitätsmuster.

Die H1-Zellen bilden dendritische Felder aus, die sich mindestens über zehn lange und acht kurze Zapfen von drei benachbarten Polycones erstrecken und die Ribbons beider Zapfentypen kontaktieren, allerdings in Anzahl und Durchmesser der kontaktierenden Dendriten eine Präferenz für die langen Zapfen zeigen (Abb. 3.4.6 D). Benachbarte H1-Zellen zeigen überlappende dendritische Felder, wobei bis zu vier verschiedene H1-Zellen denselben langen-Zapfen-Pedicle kontaktieren. Dabei sind Kontakte zweier H1-Zellen zum selben Ribbon üblich, wobei zumeist jede Zelle eine Seite des Ribbons beansprucht. Die H1-Dendriten zweier Zellen können sich aber auch dieselbe Seite des Ribbons teilen, so dass bis zu drei verschiedene H1-Zellen Kontakt zum selben Ribbon aufnehmen können.

Ähnliches gilt für die H2-Zellen. Sie kontaktieren zwar nur die kurzen Zapfen (bis zu sieben im Probevolumen; Abb. 3.4.6 E), aber auch hier können bis zu drei H2-Zellen denselben Pedicle ansteuern. Bei gleichzeitigem Kontakt von H1- und H2-Dendriten an einem Ribbon liegt die Kontaktzone der H2-Dendriten weiter vitreal als die der H1-Dendriten.

Die H3-Dendriten ziehen an den Pedicles vorbei und nehmen Kontakt zu den Stäbchen-Ribbons auf (Abb. 3.4.6 F; Abb. 3.4.10 E, F).

Bedingt durch die unterschiedliche radiale Lage ihrer Somata und durch ihre spezifische Konnektivität liegt die Länge der H1-Dendriten bei ca. 1,3 μm (kurze Zapfen) bzw. 4,5 μm (lange Zapfen), wohingegen die Dendriten der H2-Zellen eine durchschnittliche Länge von 7,6 μm , die der H3-Zellen von 24,0 μm aufweisen.

Bipolaren

Unter den knapp 100 ganz oder teilweise dreidimensional rekonstruierten Bipolarzellen konnten anhand der üblichen Merkmale (Lage und Form des Somas, Anzahl synaptischer Schwellungen und Terminationstiefe in der IPL, Form des Dendritenbäumchens, Konnektivität; z.B. Parthe, 1972; Scholes & Morris, 1972; Haverkamp et al., 2003) neun Bipolarzelltypen unterschieden werden (Abb. 3.4.7). Ihre Dendriten nähern sich von vitreal an die synaptischen Ribbons an und bilden so mit den die Ribbons flankierenden H-Dendriten eine Triade (Abb. 3.4.10 G, H).

Im Folgenden werden Neuroanatomie und Konnektivität der einzelnen Bipolarzelltypen näher beschrieben. Die Terminationstiefen der Axonterminalen in der IPL wurden ab dem vitrealen Rand der INL gemessen, bei einer gesamten Mächtigkeit der IPL von 67 μm .

Bipolarzelltyp 1

Die Kerne dieses Zelltyps liegen am skleralen Rand der INL *sensu stricto* (Abb. 3.4.7-B1) und haben eine radiale Länge von 7,4 μm und eine Breite von 4,5 μm . Das Soma geht graduell in den ca. 1,3 μm dicken Primärdendriten über, der bis zu seiner Aufzweigung in zahlreiche untergeordnete Dendriten eine Länge von ca. 27 μm misst. Da die dendritischen Felder der rekonstruierten Zellen nicht vollständig im untersuchten Volumen enthalten sind, muss eine Ausdehnung derselben von mindestens 14,5 μm x 9,8 μm angenommen werden. Die feinen Dendriten nehmen Kontakt zu den Ribbons der langen Zapfen, sowie der Stäbchen auf (Abb. 3.4.8 A; Abb. 3.4.9 A). Das Axon (Länge 31 μm , Durchmesser 500–800 nm) terminiert in der obersten OFF-Schicht der IPL (Tiefe ab vitrealem Rand der INL 1,6–13 μm) in einer knotigen Aufschwellung mit mehreren voluminösen, lateralen Verzweigungen. In den Axonterminalen sind mehrere Ribbons zu sehen.

Bipolarzelltyp 2

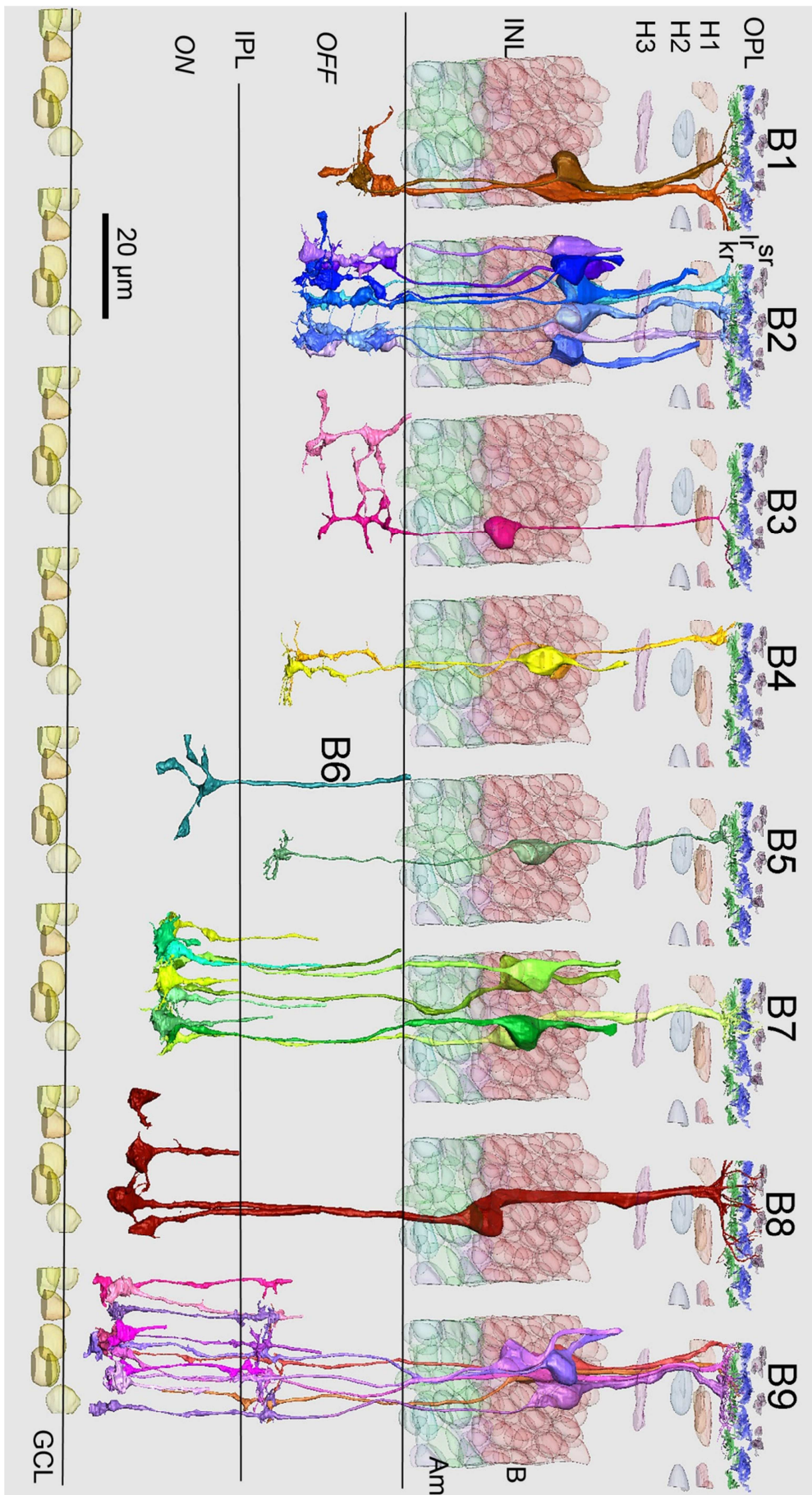
Die Nuklei, die ebenfalls am skleralen Rand der INL liegen, sind nicht von denen des Bipolarzelltyps 1 zu unterscheiden (Länge 7 μm , Breite 4,8 μm ; Abb. 3.4.7-B2). Der Primärdendrit (Länge ca. 25 μm), der bei einigen Zellen deutlich abgesetzt aus dem Soma entspringt, verläuft leicht schlängelnd mit schwankendem Durchmesser (0,6–1,3 μm) sklerad und verzweigt sich in zahlreiche feinere Dendriten (Abb. 3.4.8 B). Im dendritischen Feld (15 \times 8,7 μm) werden bevorzugt die Ribbons von langen Zapfen, gelegentlich kurzen Zapfen und von Stäbchen kontaktiert (Abb. 3.4.9 B). Das Axon, das sich auf einer Länge von ca. 35 μm durch die Nuklei der INL windet, ist mit 500–600 nm relativ dünn und endet in mehreren seriell auftretenden, knotigen Verdickungen mit feinen lateralen Verästelungen, die zur Nachbarzelle desselben Bipolartyps führen. Synaptische Ribbons sind im gesamten verdickten Terminalbereich zu finden, der sich über eine radiale Länge von 19 μm in der OFF-Schicht der IPL erstreckt (Tiefe 3–22 μm). Die Zellen treten mit einer Dichte von 186/10.000 μm^2 auf.

Bipolarzelltyp 3

Der Bipolarzelltyp 3, dessen kugelig Nukleus (Durchmesser ca. 5,5 μm) etwa in der Mitte der INL *sensu stricto* liegt (Abb. 3.4.7-B3), bildet einen relativ dünnen und geradlinig verlaufenden Primärdendriten aus (Durchmesser 330 nm, Länge 40,5 μm). Es konnten nur zwei Sekundärdendriten teilweise verfolgt werden, wovon einer eine Länge von >12 μm aufweist (Abb. 3.4.8 C; Abb. 3.4.9 C). Die Konnektivität zu den Photorezeptoren war nicht klar zu erkennen, da die Anschnitte der feinen Dendriten in unscharfen Bereichen „verschwinden“ (basale Kontakte zu den Pedicles nicht auszuschließen). Das Axon, zunächst mit einem Durchmesser von 210 nm, wird zum Ende hin dicker (bis 450 nm) und hat bis zur ersten Verzweigung eine Länge von 18,4 μm . Das Axon verzweigt sich in der obersten OFF-Schicht der IPL, reicht mit mehreren lateralen Ästen bis in eine Tiefe von ca. 20 μm und beinhaltet in diesem Bereich relativ wenige Ribbons. Die Zellen desselben Typs stehen über laterale Fortsätze offensichtlich in Kontakt.

Abb. 3.4.7 Die neun 3D-rekonstruierten Bipolartypen der Sardellenretina (Amira®). ►

B1–5 OFF-Bipolaren, **B6–9** ON-Bipolaren, **Am** (Amakrinenkerne), **B** (Bipolarkerne), **GCL** (Ganglienzellschicht), **H1–3** (Horizontalen 1–3), **INL** (innere Körnerschicht), **IPL** (innere plexiforme Schicht, mit **ON**- und **OFF**-Schicht), **kr** (Ribbons der kurzen Zapfen), **lr** (Ribbons der langen Zapfen), **sr** (Ribbons der Stäbchen).



Bipolarzelltyp 4

Die synaptischen Kontakte des Bipolarzelltyps 4 in der OPL konnten ebenfalls nicht rekonstruiert werden, da nur die Ansätze der Sekundärdendriten zu sehen sind (Abb. 3.4.8 D; Abb. 3.4.9 D; evtl. basale Kontakte). Der Primärdendrit (Länge 28,8 μm) ist nach seinem Ursprung aus dem Soma dünn (Dicke 400 nm) und wird in seinem Verlauf zur OPL allmählich dicker (bis 1 μm ; Abb. 3.4.7-B4). Die Nuklei liegen in der skleralen Hälfte der INL, mit einer Ausdehnung von 4,4 $\mu\text{m} \times 6,8 \mu\text{m}$. Das zunächst nur 300–400 nm dicke Axon schlängelt sich an den Nuklei der INL vorbei (Länge 50 μm), der letzte Abschnitt von 8–10 μm ist verdickt (Durchmesser bis 950 nm) und beinhaltet synaptische Bänder. Das Axon terminiert nach einer kegelförmigen Verdickung flach verzweigt in einer Tiefe von 22 μm in der IPL. Über ihre zahlreichen lateralen Fortsätze stehen die Zellen des Zelltyps miteinander in (räumlichem, vermutlich auch synaptischem) Kontakt.

Bipolarzelltyp 5

Sowohl lange als auch kurze Zapfen werden vom Bipolarzelltyp 5 kontaktiert (Abb. 3.4.8 E; Abb. 3.4.9 E), dessen Axon in ähnlicher Weise (flach verzweigt) aber 3 μm tiefer in der IPL terminiert als Bipolarzelltyp 4 (Abb. 3.4.7-B5). Das Axon ist auf seiner gesamten Länge von 44 μm 300–600 nm dick und Ribbons finden sich nur in der Axonterminale. Der zugehörige Zellkern hat eine ähnliche Lage und Größe wie bei Bipolarzelltyp 4. Der Primärdendrit entspringt deutlich abgesetzt dem Soma und hat eine Gesamtlänge von 33,3 μm bis zur Aufzweigung in zahlreiche untergeordnete Dendriten. Über die Ausdehnung des dendritischen Feldes kann keine Aussage gemacht werden, da nur ein Teil im untersuchten Retinavolumen liegt.

Bipolarzelltyp 6

Dieser Zelltyp konnte nur in der IPL rekonstruiert werden, wo er ein ca. 1 μm dickes, geradlinig verlaufendes Axon ausbildet (Abb. 3.4.7-B6). Es endet im obersten Bereich der ON-Schicht (Tiefe ca. 42 μm) in einer breit verzweigten, fingerförmigen Axonterminale (Gesamtdurchmesser der Terminale ca. 20 μm), deren laterale Verzweigungen zum Ende hin voluminöser werden (Durchmesser ca. 1,9 μm).

Bipolarzelltyp 7

Die ovalen Nuklei sind ca. 6,5 \times 4,2 μm groß und liegen bei diesem Zelltyp etwa in der Mitte der INL (Abb. 3.4.7-B7). Das Soma geht graduell in den ca. 38 μm langen Primärdendriten über, der mit einer Dicke von 1,2–1,6 μm relativ mächtig ist. Das dendritische Feld ist mit 10,1–9,5 μm relativ kompakt, es können Kontakte v.a. zu kurzen Zapfen und Stäbchen, aber auch zu einem langen Zapfen beobachtet werden (Abb. 3.4.8 F; Abb. 3.4.9 F). Das Axon

(Länge 63 μm) hat zunächst einen Durchmesser von ca. 1 μm , verjüngt sich in seinem weiteren Verlauf auf 240 nm und verdickt sich zum Ende hin auf knapp 2 μm , um dann in einer voluminösen Struktur zu terminieren (Tiefe 46 μm). Diese \pm pyramidal bis ovalen Axonterminalen haben Durchmesser von 3,3–4,4 μm , sind regelmäßig schachbrettförmig in der ON-Schicht der IPL angeordnet und bilden feine laterale Ausläufer zu den 4–6 angrenzenden Terminalen desselben Zelltyps aus (Abb. 3.4.10 C, D). Die verdickten proximalen Anteile des Axons, sowie die Terminalen beinhalten zahlreiche Ribbons (Abb. 3.4.10 D). Die Dichte dieses Zelltyps liegt bei 168 Zellen/10.000 μm^2 .

Abb. 3.4.8 Radiale Detailansichten der synaptischen Zonen der 3D-rekonstruierten Bipolarzelltypen in der OPL (Amira[®]; vgl. korrespondierende Tangentialansichten in Abb. 3.4.9). ►

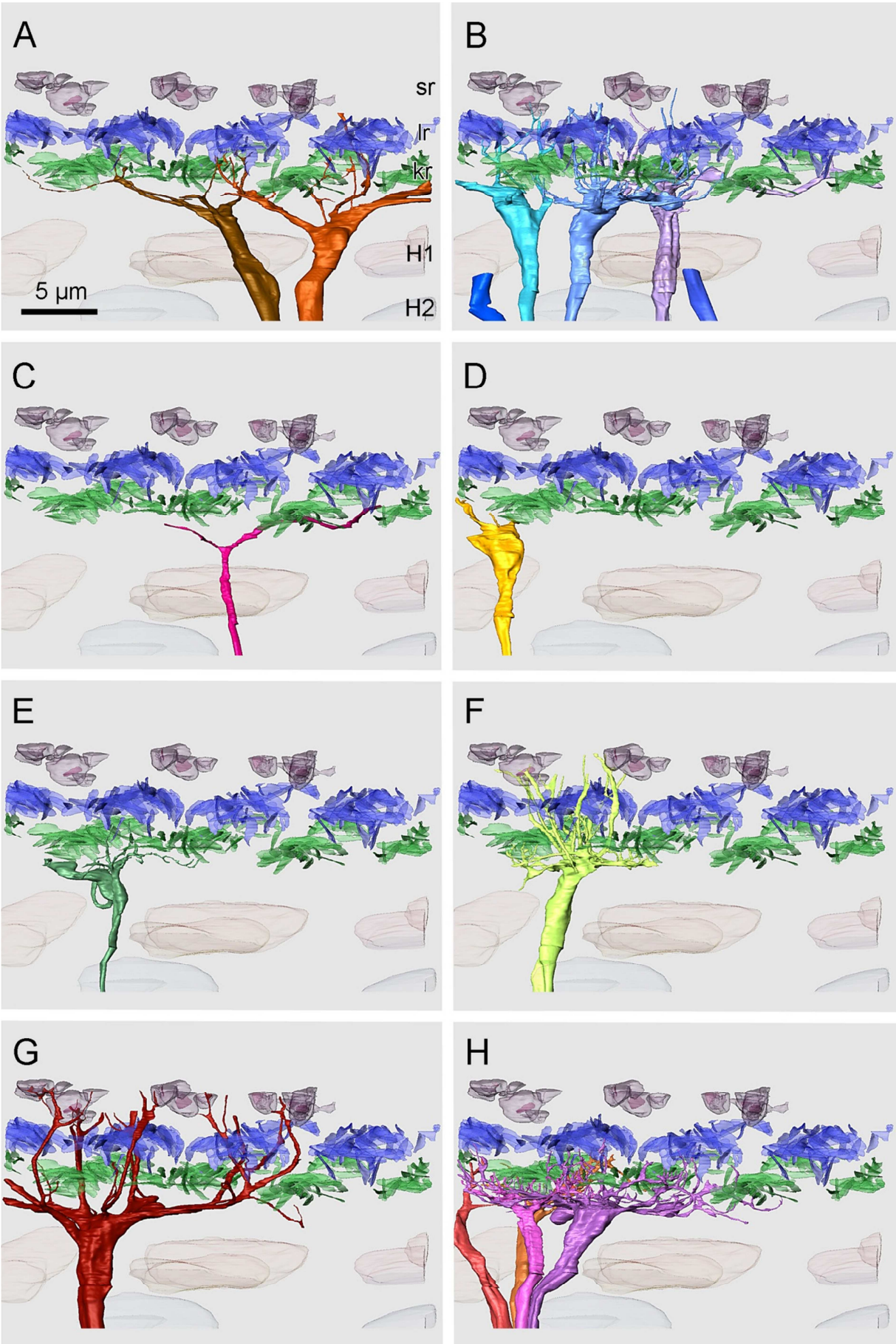
H1–2 (Kerne der Horizontalzelltypen 1–2), **kr** (Ribbons der kurzen Zapfen, grün), **lr** (Ribbons der langen Zapfen, blau), **sr** (Ribbons der Stäbchen).

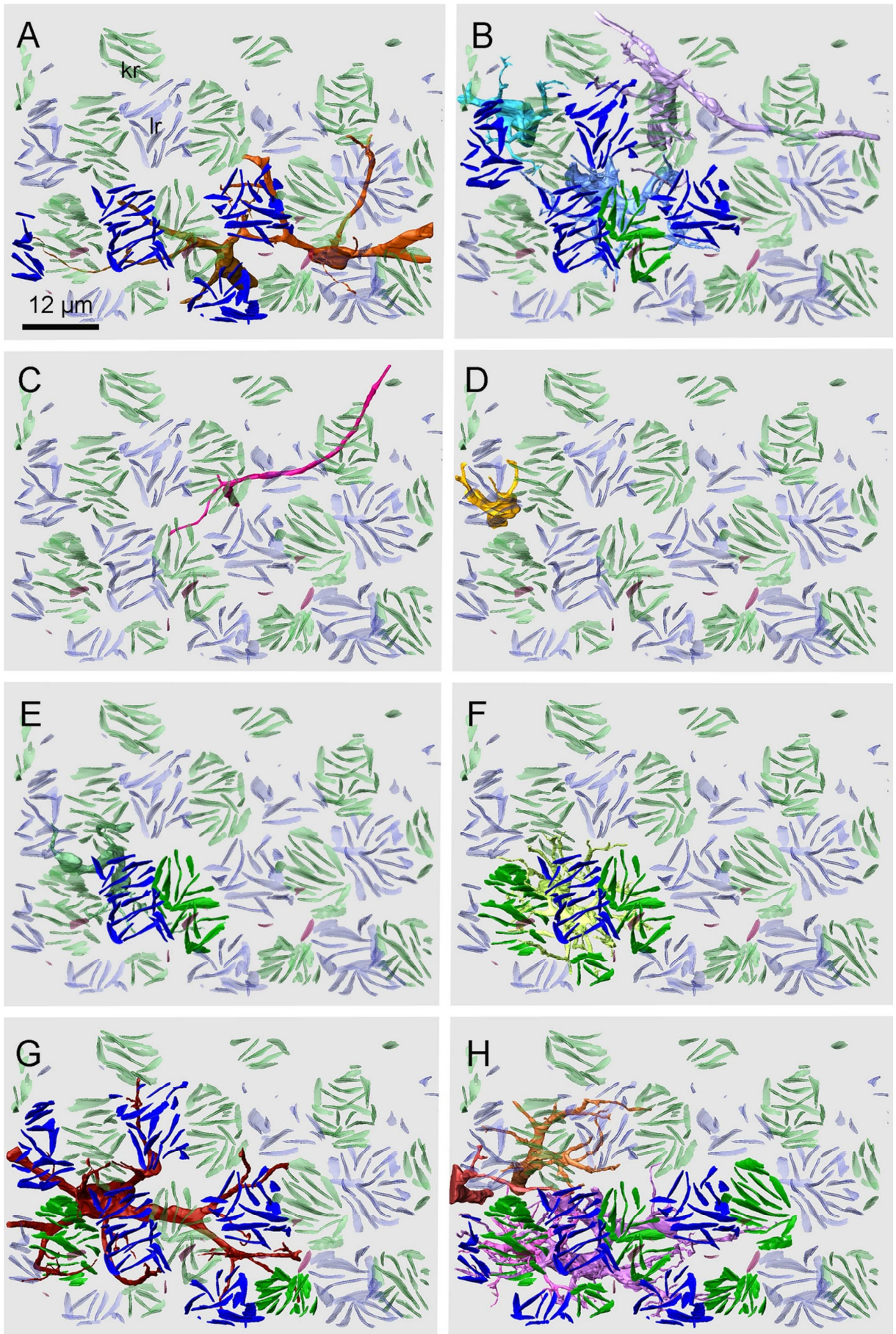
A Bipolarzelltyp 1 kontaktiert lange Zapfen und Stäbchen. **B** Bipolarzelltyp 2 kontaktiert lange und kurze Zapfen, sowie Stäbchen. **C** Die Kontaktzonen des Bipolarzelltyps 3 sind nicht eindeutig identifizierbar. **D** Die Kontaktzonen des Bipolarzelltyps 4 sind nicht eindeutig identifizierbar. **E** Bipolarzelltyp 5 kontaktiert lange und kurze Zapfen. **F** Bipolarzelltyp 7 kontaktiert kurze Zapfen, gelegentlich lange Zapfen und Stäbchen. **G** Bipolarzelltyp 8 kontaktiert lange und kurze Zapfen, sowie Stäbchen. **H** Bipolarzelltyp 9 kontaktiert lange und kurze Zapfen, evtl. Stäbchen.

Abb. 3.4.9 Tangentiale Detailansichten der dendritischen Felder der 3D-rekonstruierten Bipolarzelltypen und die kontaktierten Zapfen (Amira[®]; vgl. korrespondierende Radialansichten in Abb. 3.4.8). ►►

Die Ribbons der Zapfen, die von einer Bipolarzelle des jeweiligen Typs kontaktiert werden, sind massiv dargestellt (**lr**: Ribbons der langen Zapfen, blau; **kr**: Ribbons der kurzen Zapfen, grün), die benachbarten, nicht kontaktierten Ribbons transparent. Einige der untersuchten Bipolaren sind nicht vollständig im Volumen!

A Eine Bipolare des Typs 1 kontaktiert vier lange Zapfen. **B** Eine Bipolare des Typs 2 kontaktiert vier lange und einen kurzen Zapfen. **C** Die Kontaktzonen des Bipolarzelltyps 3 sind nicht eindeutig identifizierbar. **D** Die Kontaktzonen des Bipolarzelltyps 4 sind nicht eindeutig identifizierbar. **E** Eine Bipolare des Typs 5 kontaktiert jeweils einen langen und kurzen Zapfen. **F** Eine Bipolare des Typs 7 kontaktiert drei kurze und einen langen Zapfen. **G** Eine Bipolare des Typs 8 kontaktiert fünf lange und zwei kurze Zapfen. Das dendritische Feld ist nicht vollständig im untersuchten Volumen. **H** Eine Bipolare des Typs 9 kontaktiert jeweils fünf lange und kurze Zapfen.





Bipolarzelltyp 8

Die Zellkerne dieses Zelltyps liegen tief in der INL, an der Grenze zwischen Bipolar- und Amakrinenkernen, sind in etwa kugelig und messen ca. 6 µm im Durchmesser (Abb. 3.4.7-B8). Dem Soma entspringt ein mächtiger Primärdendrit (Durchmesser 2,5–3,5 µm), der auf seiner gesamten Länge von 46 µm geradlinig sklerad zieht.

Die zahlreichen untergeordneten Dendriten nehmen Kontakt zu langen und wenigen kurzen Zapfen, sowie zu zahlreichen Stäbchen auf (Abb. 3.4.8 G; Abb. 3.4.9 G). Obwohl nicht das komplette dendritische Feld im Probevolumen liegt, wird deutlich, dass sich die Dendriten kammartig von einer länglichen Symmetrieachse abspalten (Abb. 3.4.9 G). Wenn man Spiegelsymmetrie in x- und y-Richtung voraussetzt, ergibt sich ein dendritisches Feld von ca. 28,5 × 15,5 µm – das Größte der untersuchten Bipolaren (ca. 5 × 3 Pedicles).

Das mächtige Axon (Durchmesser 1,2–1,6 µm) zieht auf einer Länge von 18,4 µm geradlinig vitread durch INL und IPL, um schließlich in einer ovoiden Terminale in der ON-Schicht der IPL zu enden. Die Axonterminale misst radial 8,5 µm, horizontal 4,9 µm, liegt in einer Tiefe der IPL von ca. 54 µm und beinhaltet mehrere synaptische Ribbons. Ihr entspringen laterale Ausläufer zu benachbarten Axonterminalen desselben Zelltyps.

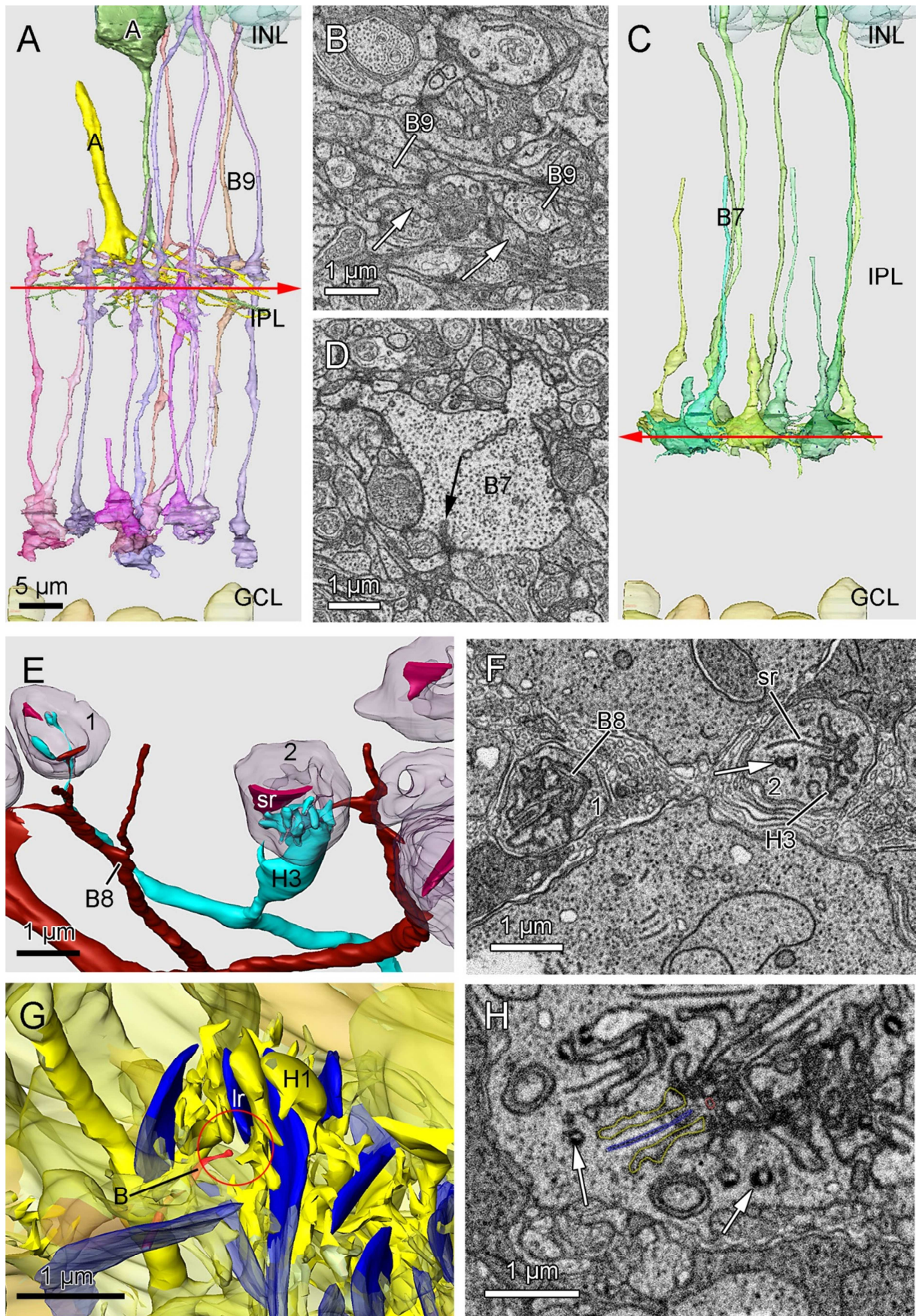
Bipolarzelltyp 9

Der Bipolarzelltyp 9 bildet reich verzweigte, buschige Dendritenbäumchen aus, die Kontakt zu langen und kurzen Zapfen aufnehmen (Abb. 3.4.7-B9, Abb. 3.4.8 H; Abb. 3.4.9 H). Einige Dendriten scheinen an den Zapfenribbons vorbei zu führen, ein Kontakt zu Stäbchenribbons konnte aber nicht eindeutig bestätigt werden. Das dendritische Feld einer Zelle dieses Zelltyps erstreckt sich über 21,3 µm × 9,1 µm und umfasst 11 Zapfen (Abb. 3.4.9 H).

Abb. 3.4.10 Details der plexiformen Schichten (FIB-FESEM, Amira®). ►

A (Amakrine), **B** (Bipolardendrit), **B7–9** (Bipolarzelltyp 7–9), **GCL** (Ganglienzellschicht), **H1, 3** (Horizontalzelltyp 1, 3), **INL** (innere Körnerschicht), **IPL** (innere plexiforme Schicht), **Ir** (Ribbon eines langen Zapfens), **sr** (Stäbchenribbon).

A Kostratifizierung eines Amakrinentyps mit dem Bipolarzelltyp 9 (**B9**) in der OFF-Schicht der IPL. Der rote Pfeil markiert die Schnittebene von B. **B** Elektronenmikroskopische Aufnahme der Kostratifizierungszone eines Amakrinentyps (**Pfeile**) mit dem Bipolarzelltyp 9 (**B9**). **C** Die Axone und Axonterminalen des Bipolarzelltyps 7 (**B7**) in der IPL. Der rote Pfeil markiert die Schnittebene von D. Maßstab wie in A. **D** Elektronenmikroskopische Aufnahme der Axonterminalen einer B7-Bipolarzelle (**B7**). In den Terminalen finden sich zahlreiche synaptische Bänder (**Pfeil**). **E** Rekonstruktion der synaptischen Zonen zweier Stäbchen (**1, 2**) mit Kontakt zu einer **B8**-Zelle und einem **H3**-Dendriten. **F** Elektronenmikroskopische Aufnahme der synaptischen Zonen aus E. Die elektronendichten Spinules der Horizontalzelle sind zu erkennen (**Pfeil**). **G** Rekonstruktion der synaptischen Zone eines langen Zapfens. **H1**-Dendriten und ein Bipolardendrit (**B**) bilden die typische Triade am Ribbon (**Ir**). **H** Elektronenmikroskopische Aufnahme der synaptischen Zonen aus G. Die entsprechenden Strukturen sind wie in G farbcodiert. Die elektronendichten Spinules der Horizontalzelle sind zu erkennen (**Pfeil**).



Der Primärdendrit hat einen schwankenden Durchmesser von 0,8–1,2 μm und eine Länge von ca. 35 μm . Die Zellkerne liegen am skleralen Rand der INL und sind oval mit einem radialen Durchmesser von ca. 6,4 μm und einem horizontalen Durchmesser von ca. 4,8 μm . Das Axon (Länge 81 μm , Durchmesser 0,4–1,3 μm) bildet in einer IPL-Tiefe von 28 μm (evtl. noch OFF-Schicht) Verdickungen (bis 1,3 μm) und feine horizontale Verästelungen, die mit denen der Nachbarzellen desselben Typs und mit Amakrinen in räumlichem Kontakt stehen (Abb. 3.4.10 A, B). Ab dieser Zone kommt es für weitere 15 μm zu Verdickungen des Axons mit synaptischen Ribbons. Das Axon endet tief in der IPL (Tiefe ca. 58 μm , ON-Schicht) und bildet knotige Terminalen, die zahlreiche Ribbonsynapsen enthalten und teilweise an die Ganglienzellsomata angrenzen. Diese Terminalen haben eine radiale Ausdehnung von ca. 5,5 μm , ihr horizontaler Durchmesser beträgt 2,5–5,5 μm und sie bilden ebenfalls feine horizontale Fortsätze zu den Nachbarn desselben Zelltyps aus. Im Volumen ist die Zelldichte $242/10.000 \mu\text{m}^2$.

Die restlichen, zahlreichen (zumindest im Somabereich rekonstruierten) Bipolarzellen konnten keinem speziellen Bipolarzelltyp zugeordnet werden, da nur Teile von ihnen im Probenvolumen enthalten sind. Dies bedeutet auch, dass die neun identifizierten Bipolarzelltypen – vermutlich – nur einen Teil der existierenden Typen darstellen.

Amakrinen

Im untersuchten Retinavolumen sind insgesamt 31 Amakrinensomata und -kerne enthalten, viele davon nur partiell, da Amakrinen sehr große Zellen mit weiten dendritischen Verzweigungen darstellen. Im Geflecht der IPL sind unzählige Anschnitte von Amakrinen-dendriten, deren Somata und Nuklei außerhalb des Probenvolumens liegen und somit nicht, oder nicht eindeutig, identifiziert und rekonstruiert werden konnten.

Anhand ihrer Kerngröße, -lage und -innenstruktur, sowie anhand der cytoplasmatischen Struktur lassen sich zunächst drei Amakrinenklassen identifizieren:

- Typ A1 (Abb. 3.4.11 A): Relativ elektronendichter, homogener Nukleus v.a. in der skleralen Hälfte der Amakrinenkerne in der INL, aber auch bis zum vitrealen Rand eingestreut; Kerndurchmesser ca. 7,5 $\mu\text{m} \times 4,5 \mu\text{m}$; relativ elektronendichtes Cytoplasma mit ausgeprägtem endoplasmatischem Reticulum.
- Typ A2 (Abb. 3.4.11 B): Relativ elektronenlichter, homogener Nukleus in der vitrealen Hälfte der Amakrinenkerne in der INL; Kerndurchmesser 6,3–8,0 $\mu\text{m} \times 3,7$ –5,6 μm ; elektronenlichtes Cytoplasma mit ausgeprägtem endoplasmatischem Reticulum.
- Typ A3 (Abb. 3.4.11 C): Relativ elektronendichter, heterogen granulierter Nukleus am vitrealen Rand der Amakrinenkerne in der INL; Kerndurchmesser ca. 7,6 $\mu\text{m} \times 6,0 \mu\text{m}$; Cytoplasma mit mittlerer Elektronendichte.

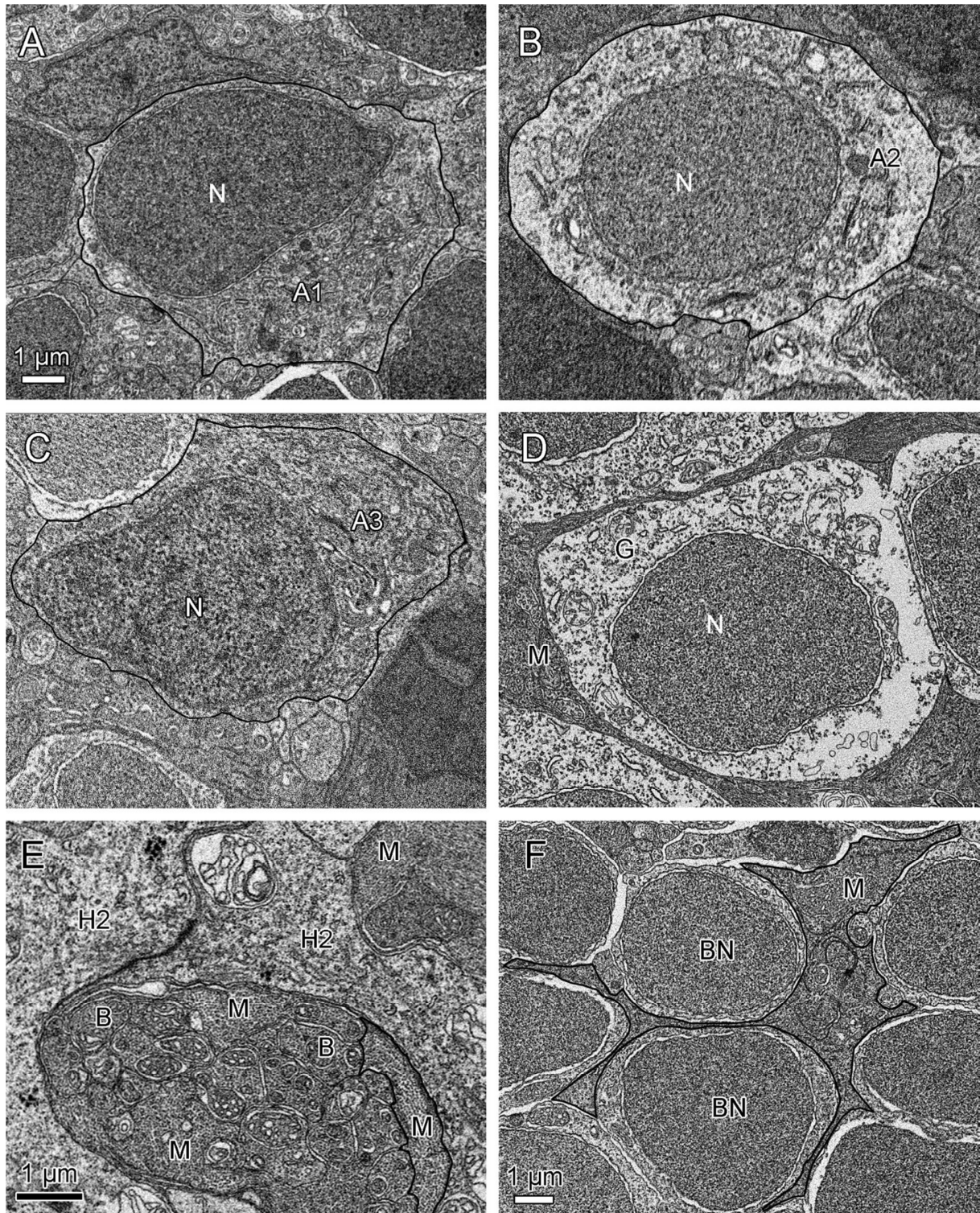


Abb. 3.4.11 Elektronenmikroskopische Aufnahmen (FIB-FESEM) der Amakrinen (A–C), einer Ganglienzelle (D), sowie der Müllerzellen (E, F). Zellmembranen teilweise hervorgehoben.

A1–3 (Amakrinentyp 1–3), **B** (Bipolardendrit), **BN** (Bipolarnukleus), **G** (Ganglienzelle), **H2** (Horizontalzelle 2), **M** (Müllerzelle), **N** (Nukleus).

A Amakrinentyp 1 (**A1**) mit elektronendichtem Nukleus und Soma. **B** Amakrinentyp 2 (**A2**) mit elektronenlichtem Nukleus und Soma. **C** Amakrinentyp 3 (**A3**) mit heterogen granuliertem Nukleus und Soma von mittlerer Elektronendichte. **D** Ganglienzelle (**G**) mit umgebenden Müllerzellen (**M**). **E** Die Müllerzellen (**M**) ziehen zusammen mit Bipolardendriten (**B**) durch die Lücken im Netz der Horizontalzellen 2 (**H2**). **F** Weit verzweigtes, gelapptes Müllerzellsoma in der INL zwischen den Bipolarsomata samt Nuklei (**BN**).

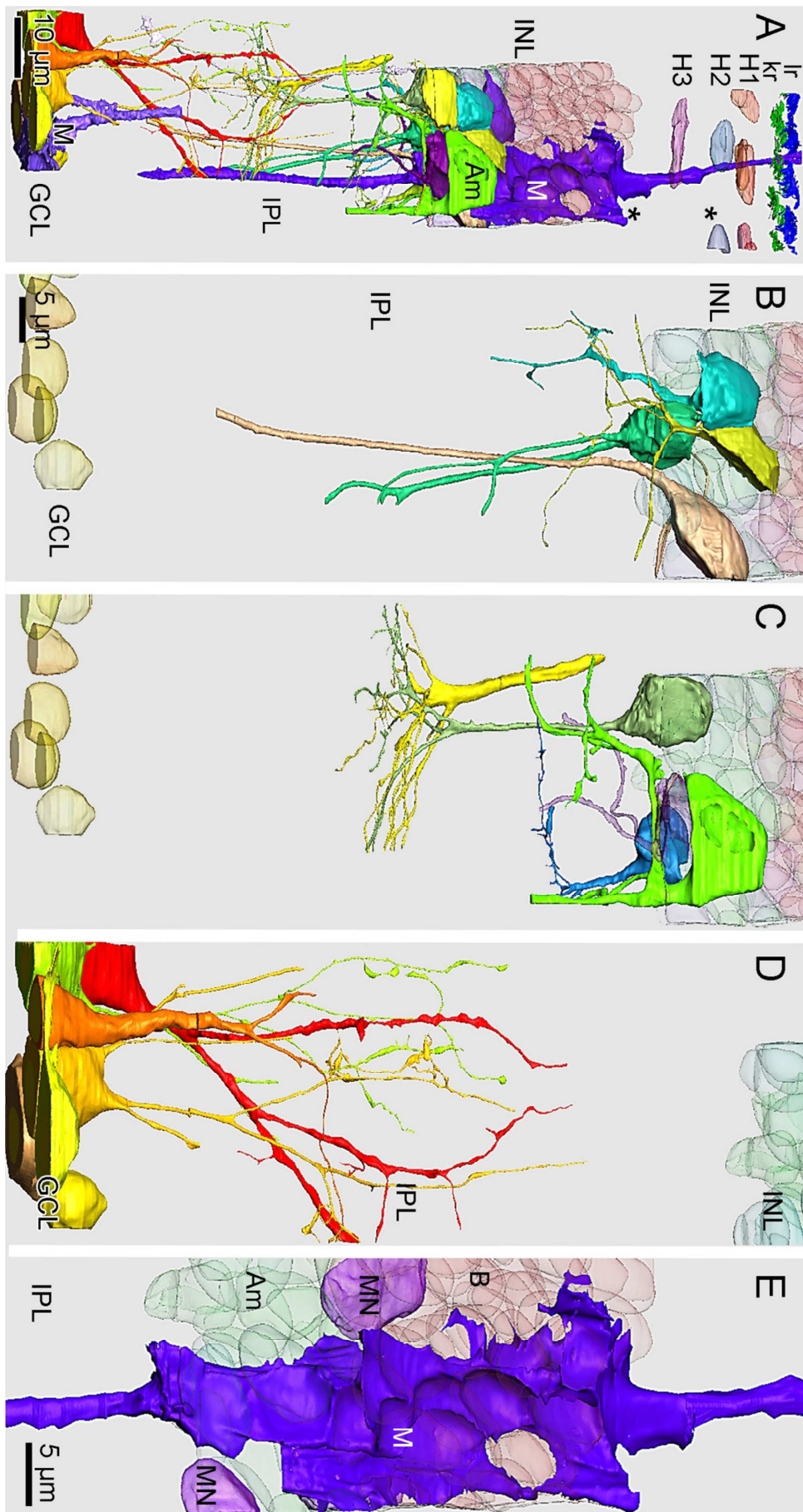
Diese grobe Dreiteilung kann in der Morphologie der gesamten Zellanteile von 14 rekonstruierten Amakrinenzellen im Volumen nicht wieder gefunden werden, die Amakrinenpopulation spaltet sich in zahlreiche Subtypen auf. Sowohl Form und Größe der Zellsomata und Dendriten, als auch ihre Terminationstiefen in der IPL variieren deutlich von Zelle zu Zelle, auch innerhalb der oben genannten Typen (Abb. 3.4.12 B, C). Zellen des häufigsten Amakrinentyps A1 bilden entweder dünne dendritische Verzweigungen im OFF-Teil der IPL (Abb. 3.4.12 B, gelbliche Zelle), oder dicke Dendriten aus, die tief in die IPL reichen (Abb. 3.4.12 B, beige und grüne Zelle). Die (rekonstruierten Anteile der) Dendriten des zweithäufigsten Amakrinentyps A2 enden in der OFF-Schicht der IPL und sind ebenfalls vielgestaltig (Abb. 3.4.12 C): starke laterale Fortsätze im obersten Teil der IPL (hellgrüne Zelle), sowie etwas tiefere, feine, laterale Verzweigungen (blaue Zelle) sind ebenso ausgeprägt wie buschige Dendritenbäumchen am vitrealen Ende der OFF-Schicht (gelbe und dunkelgrüne Zelle). Eine Kostratifizierung der synaptischen Zonen des letztgenannten Amakrinen-Subtyps mit Bipolarzelltyp 9 und damit verbundener synaptischer Kontakt scheint wahrscheinlich (Abb. 3.4.10 A). Aus dem Soma des Amakrinentyps A3 (eine rekonstruierte Zelle) entspringen zwei Dendriten, die rasch aus dem Volumen laufen (Abb. 3.4.12 C, violette Zelle).

Da die verschiedenen Amakrinen jeweils in räumlichem Kontakt zu Bipolarzellen verschiedener Typen stehen (keine Ausbildung von Ribbons bei Amakrinen), muss ein synaptischer Kontakt mit diesen angenommen werden.

Abb. 3.4.12 Dreidimensional rekonstruierte Amakrinen und Ganglienzellen, sowie eine Müllerzelle in radialer Ansicht (Amira®). ►

Am (Amakrine/Amakrinenkern), **H1–3** (Horizontalzelltypen 1–3), **GCL** (Ganglienzellschicht), **INL** (innere Körnerschicht), **IPL** (innere plexiforme Schicht), **kr** (Ribbons der kurzen Zapfen), **lr** (Ribbons der langen Zapfen), **M** (Müllerzelle), **MN** (Müllerzellnukleus).

A Radiale Ansicht aller rekonstruierten Amakrinen, Ganglienzellen und Müllerzellen. Die * markieren die radiale Ausdehnung des Müllerbandes. **B** Ausgewählte, rekonstruierte Amakrinen des Typs 1. Man beachte die unterschiedlichen Arborisierungsmuster ihrer Dendriten. **C** Ausgewählte, rekonstruierte Amakrinen des Typs 2 (grünlich, blau) und 3 (transparent, violett). Man beachte die unterschiedlichen Arborisierungsmuster ihrer Dendriten. **D** Sechs Ganglienzellen konnten im Volumen rekonstruiert werden. **E** Das Soma einer Müllerzelle (**M**) innerhalb der INL. Die Müllerzellnuklei (**MN**) liegen zwischen den Amakrinenkernen (**Am**) bzw. am Übergang zwischen Amakrinen- und Bipolar-kernen (**B**).



Ganglienzellen

Bei den Ganglienzellen stellt sich ein ähnliches Problem wie für die Amakrinen dar: auch ihre Somata sind groß (Durchmesser bis 15 μm) und das dendritische Feld sehr weit, so dass nur Teile davon im Probenvolumen rekonstruiert werden konnten (Abb. 3.4.12 A, D). Die Primärdendriten haben beim Verlassen des Somas an dessen skleralem Bereich je nach Zelle Durchmesser von 440 nm bis 2,4 μm und ziehen meist sklerad in die IPL, wo sie sich verzweigen und zahlreiche, knotige Verdickungen ausbilden, in denen je ein Mitochondrium liegt (Abb. 3.4.12 D). Bei einigen Ganglienzellen entspringen nur im lateralen Bereich des Somas Dendriten und führen horizontal weiter. Die Ganglienzelldendriten bilden keine synaptischen Bänder aus. Die Dendriten von vier der sechs 3D-rekonstruierten Ganglienzellen stehen in räumlichem – und dadurch vermutlich in synaptischem Kontakt – zu Bipolaren des Typs 7 und/ oder 9 (in der OFF-Schicht), sowie teilweise zu den mit Bipolartyp 9 kostratifizierenden Amakrinen (vgl. Abb. 3.4.10 A). Diese Ganglienzelldendriten reichen zwischen 42–50 μm sklerad, enden also in einer IPL-Tiefe von 15–23 μm . Zwei Ganglienzellen bilden laterale Primärdendriten aus, die ohne sichtbaren Kontakt zu anderen Zellen aus dem Probevolumen führen.

Müllerzellen

Müllerzellen sind im tangentialen Querschnitt eindeutig an ihrer hohen Dichte von radial verlaufenden Filamenten zu erkennen (Abb. 3.4.11 E). Sie reichen von der *outer limiting membrane* (OLM) bis vitreal der GCL zur *inner limiting membrane* (ILM). Die ab dem Soma sklerad führende Hauptachse einer Müllerzelle, deren Durchmesser sich nach sklerad verjüngt (1,9–0,9 μm), kann radial durch das gesamte Müllerband hindurch verfolgt werden. Aufgrund der FIB-FESEM-bedingten, mäßigen Auflösung konnten die Stellen, an denen sich die Zellmembran zum mächtigen Müllerband aufweitert, nicht identifiziert werden (eine extrazelluläre Natur des Fasermaterials ist ebenfalls nicht auszuschließen: WK Stell, pers. Mittlg.). Das ca. 14 μm mächtige Müllerband nimmt den Raum von der vitrealen Seite der H2 bis an den skleralen Rand der H1-Axonterminalen ein (Abb. 3.4.12 A; s. auch Abb. 3.1.3). Die Müllerzellen bilden in der INL ein stark gelapptes und verzweigtes Soma aus, das sich über die gesamte radiale Ausdehnung der INL *sensu stricto* erstreckt (Abb. 3.4.12 A, E). Die Soma-Ausläufer füllen den Raum zwischen den Zellen der INL (v.a. Bipolarzellen), wodurch sie teilweise auf einen Durchmesser von ca. 70 nm gedrängt werden (Abb. 3.4.11 F). Da sich benachbarte Müllerzellen in der INL mit ihren Ausläufern berühren, entsteht der Eindruck eines Netzes aus Müllerzellsomata, in deren Zwischenräume die Bipolarzellen und Amakrinen eingebettet sind.

Die assoziierten Nuklei (fünf im Volumen) befinden sich in der vitrealen Hälfte der INL, haben eine radiale Ausdehnung von 6,3–10,9 μm und sind lateral abgeflacht (Durchmesser ca. 2,8 μm ; Abb. 3.4.12 E).

Die proximalen Anteile der Müllerzellen (ab dem Soma vitread) verlaufen zunächst geradlinig mit kleineren, lateralen Verzweigungen durch die IPL (Abb. 3.4.12 A). Auf Höhe der Ganglienzellen verbreitern sie sich und bilden zahlreiche Fortsätze, die benachbarte neuronale Strukturen umhüllen und schließlich zwischen die Ganglienzellsomata reichen (Abb. 3.4.12 A; Abb. 3.4.11 D).

Diskussion

Die durchgeführten ultrastrukturellen Untersuchungen verfeinern das bisherige lichtmikroskopische Strukturbild der inneren Sardellenretina und erweitern es um eine detaillierte Analyse der dreidimensionalen Feinstruktur einzelner Zellen und Zelltypen. Zur Annäherung an ein Verständnis von Verschaltungsregeln und -geometrie im komplexen neuronalen Netzwerk der Vertebratenretina wurden zwei dreidimensionale, elektronenmikroskopische Ansätze, mit unterschiedlichen Lösungsvorschlägen des „Auflösung-zu-Probevolumen-Problems“, erprobt.

TEM-3D

Die „klassische“ Ultradünnschnittserie, die sehr hohe xy-Auflösung bei mäßiger z-Auflösung bietet (ca. 60–80 nm), birgt für den 3D-Ansatz offensichtliche Probleme durch unvermeidbare Verzerrungsartefakte. So können 3D-Rekonstruktionen auf der Basis von TEM-Serien in kleinen Volumina durchgeführt werden, z.B. Photorezeptorterminalen (Mensch: Jastrow, www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/EMHRetinaE.html) oder Bipolar-Axonterminalen (Kaninchen: Strettoi et al., 1990), diese Methode ist aber für kleine Strukturen in größeren Volumina unzureichend. Die Verzerrungsartefakte, die mit der Größe des Probevolumens zunehmen, können durch elastische Registrierung des Bilderstapels reduziert werden. Diese neue Methode bedarf aber weiterer Optimierungsschritte (StackReg-tool in Fiji nach Thévenaz et al., 1998). Weiterhin ist die Datenakquise am TEM für einen großen Bildausschnitt in hoher Auflösung sehr zeitaufwändig, da meist mehrere Bilder mit Überlappung aufgenommen und anschließend zu einem Gesamtbild zusammengefügt werden müssen (s. Abb. 3.4.2 C).

Somit blieb das in dieser Arbeit untersuchte Probevolumen auf die OPL beschränkt, lässt aber durch die Kombination mit der 3D-Rendering-Software Amira® erste Erkenntnisse über Neuroanatomie und Verschaltungsregeln der Sardellenretina zu (Abb. 3.4.2 A, B). So konnte

eine bereits bestehende Ultradünnschnittserie mit moderner Software neu untersucht und die Erkenntnisse erweitert werden (vgl. auch Heß, 2000: Abb. 3.33). Obwohl synaptische Ribbons durch die großen Struktursprünge zwischen den Bildern eines Bilderstapels schwer zu verfolgen sind, ist es möglich, bestehende Aussagen zur Konnektivität der Horizontalzellen (Heß et al., 2002) zu verfeinern und ggf. zu korrigieren: beide Zapfentypen werden von H1-Zellen kontaktiert, wobei deren Dendriten sich dabei lateral an die Ribbons anschmiegen. Aufgrund der Beschränkung des Probevolumens in radialer Richtung ist es kaum möglich, die Dendriten der beiden tiefer gelegenen H-Zellen zu unterscheiden, die Verzerrungen verhindern das Verfolgen feinerer H-Zell- und Bipolardendriten.

FIB-FESEM

Dieser derzeit modernste Ansatz zur Gewinnung von 3D-Strukturdaten in elektronenmikroskopischer Auflösung ist gerade erst verfügbar, die ersten „Testscans“, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, weisen noch Unstimmigkeiten wie Unschärfe und Auswandern des Schneidfensters auf. Die Datenakquise ist, trotz Wegfallens der mechanischen Schnittserie, zeitaufwändig und kostenintensiv. Die resultierenden Datenstapel stellen Herausforderungen an Hard- und Software, die manuelle Segmentierung bleibt zudem extrem arbeits- und zeitintensiv.

Trotzdem führt diese Methode zu einmaligen 3D-Datensätzen bzgl. Auflösung (10 nm isotropisch, also auch z-Auflösung!), Alignment und digitalem *Reslicing*. Es ist möglich, potentiell alle Zellen im Probevolumen und ihre Verbindungen zueinander ohne spezifische Färbungen darzustellen und zu untersuchen. Jedoch stößt man auch bei dieser Methode auf Grenzen, da die Zellen aufgrund ihrer weitverzweigten Morphologie (teilweise) aus dem Probevolumen auswandern und zahllose Dendriten von Zellen außerhalb des Probevolumens angeschnitten sind und somit nicht zugeordnet werden können. Die „Schnittserie“ (eigentlich *block-face*-Serie) enthüllt durch ihre an TEM-Qualität heranreichenden Bilder viele Feinstrukturdetails aus allen Retinaschichten, von der OPL bis zur GCL.

Ähnliche Datensätze liefert die *serial-block-face electron microscopy* (SBEM) mittels eines „Heidelberger Hobels“, wobei die Schnitte mechanisch durch ein Mikrotom gefertigt werden (s. Briggman et al., 2011).

*Neue Erkenntnisse zur **Feinstruktur und Neuroanatomie** der Sardellenretina*

Nach Segmentierung und *SurfaceRendering* der Neurone wird es möglich, einzelne Zellen bis in die feinsten Verästelungen zu verfolgen (sofern sie nicht aus dem Probenvolumen auswandern oder Unschärfen auftreten). Elektronenmikroskopische Detailuntersuchungen einer individuellen Zelle waren bisher entweder in der OPL oder in der IPL möglich (z.B. Hidaka et al., 1986; Haesendonck & Missotten, 1984; Strettoi et al., 1990), selten wurden

ganze Nervenzellen rekonstruiert und in verringerter Auflösung dargestellt (siehe z.B. http://retina.anatomy.upenn.edu/cells/lab_cells.html). Die FIB-FESEM-Methode vereint subzelluläre Ultrastrukturuntersuchung mit zellulärer Neuroanatomie an derselben und v.a. ungefärbten (!) Zelle.

Photorezeptoren

Hier gelang eine dreidimensionale und hoch aufgelöste Darstellung der Pedicles, was von Heß et al. (2002) weniger umfangreich begonnen wurde. Es ergibt sich eine unerwartet komplexe, durch zahlreiche mehr oder weniger lange Fortsätze stark „zerfrante“ Vitrealseite bei langen und kurzen Zapfenpedicles. Die auf Tangentialschnitten deutlich sichtbaren zwei Ribboncluster der langen Zapfen (Heß et al., 2002) sind in der 3D-Ansicht schwer nachvollziehbar (vgl. Heß et al., 2002: fig. 3 C mit Abb. 3.4.9).

Bei *E. encrasicolus* stehen die Pedicles der Zapfen über tief in die anderen Pedicles invagierende Telodendriten in engem Kontakt mit ihren direkten Nachbarn desselben oder des anderen Typs, was erstmals von Lasansky (1972) für die Schildkröte beschrieben wurde (s.a. Kolb & Jones, 1985; Ammermüller & Kolb, 1996). Die übliche Verbindung der Zapfen über Gap-Junctions, wie sie in den meisten Vertebratentaxa zu finden ist (Nilsson, 1964; Cohen, 1965; Missotten, 1966; Sjöstrand, 1969; Lasansky, 1972; Tsukamoto et al., 1992; vgl. auch Heß, 2000), konnte – evtl. aufgrund der schlechteren Auflösung gegenüber TEM – anhand der Aufnahmen des FIB-FESEMs nicht erkannt werden.

Die von Heß (2000) bereits beschriebenen Membranfaltensysteme im Pedicle basieren auf einer Selbstinvagination der Zapfen, was erst durch die dreidimensionale Verfolgung von Telodendriten eindeutig erkannt werden konnte und zuvor noch nicht beschrieben wurde (s. Abb. 3.4.4 F). Häufig bilden H-Zelldendriten direkt skleral der eigentlichen synaptischen Zone große elektronenlichte Aufschwellungen in den Pedicles, was meist durch das Vorhandensein von spinules zu erkennen ist (Abb. 3.4.4 G) und die vermutlich Fixierungsartefakte darstellen.

Das auf Tangentialschnitten sichtbare synaptische „Dendritengewirr“ an der Pediclebasis, das bei Wirbeltieren bisher nur durch spezifische Färbungen einzelner Zellen teilweise aufgelöst wurde (Golgi-Färbung, IHC oder gezielte Mikroinjektion), kann durch die 3D-Rekonstruktion nun gänzlich in die einzelnen Bestandteile aufgedröselt und somit die Konnektivität potentiell jeder Zelle untersucht werden (s. u.).

Horizontalzellen

Die Organisation der H-Zellen in distinkte Horizonte skleral der Bipolarsomata bei *E. encrasicolus* entspricht einem Schema, wie es auch für andere Teleostei beschrieben ist. Bei Goldfisch (Stell, 1967), Zebrafisch (Connaughton et al., 2004) und Karpfen (Witkovsky & Dowling,

1969) finden sich ein bis zwei, bei Centropomiden (Parthe, 1972) drei H-Zell-Horizonte, während sich vier Schichten bei Vertretern der Mugiliden, Gerreiden, Lutjaniden und Moroniden (Selvín de Testa, 1966; Parthe, 1972; Dowling et al., 1985) unterscheiden lassen (vgl. auch Ali & Anctil, 1976). Diese \pm distinkten Horizonte können auch mehrere H-Zelltypen mit unterschiedlicher Konnektivität beinhalten (vgl. Stell, 1967 und Stell & Lightfoot, 1975). Bei höheren Vertebrata bilden die Horizontalen ebenfalls den skleralen Abschluss der INL, sind aber radial nicht deutlich gegeneinander abgesetzt (Burris et al., 2002; Cuenca et al., 2002; Wässle, 2004; Lee et al., 2010). Die Horizontalzellen der einzelnen Etagen unterscheiden sich morphologisch und bzgl. ihrer Flächendichte – offenbar spiegeln sich darin auch funktionelle Unterschiede wider (v.a. Konnektivität).

Wie bei anderen Clupeiformes treten in der H-Zell-Zone Müllerfasern auf (Heß, 2000; Heß et al., 2006). Dies ist auch bei anderen, nicht aber bei allen Fischen zu finden, bzw. ist auf mäßig gut erhaltenen histologischen Semidünnschnitten nicht zweifelsfrei erkennbar (Parthe, 1972; Selvín de Testa, 1966; Ali & Anctil, 1976; Linser et al., 1985). Die Müllerfasern, die zwischen die Horizontalen reichen, bewirken vermutlich eine elektrische Isolation v.a. der H3-Zellen (Stäbchen-Kontakte!).

Die breitflächigen Gap-Junctions (= elektrische Synapsen nach Revel & Karnovsky, 1967) zwischen Somata von Zellen desselben H-Typs unterstützen die These vom elektrischen Syncytium (Kaneko, 1971) bei der Bewerkstelligung ihrer Aufgabe der lateralen Inhibition. Die fehlende Kommunikation über Gap-Junctions zwischen Zellen unterschiedlicher H-Typen und die Anordnung in distinkten Schichten lässt auf separate Kanäle für die Verrechnung von Photorezeptorsignalen und somit auf photorezeptorspezifische Konnektivität schließen (Stell, 1967; Kaneko & Yamada, 1972). Die H1-Axone bei *E. encrasicolus* sind besonders auffällig ausgebildet und im Bereich ihrer Terminalen ebenfalls durch Gap-Junctions miteinander verbunden. H-Axone, die in der INL enden, findet man auch bei anderen Fischen, entweder bei allen zapfenkontaktierenden H-Zellen (Stell, 1967; Wagner, 1976; Weiler, 1978; Marshak & Dowling, 1987) oder, wie bei der Sardelle, nur in bestimmten H-Zelltypen (Zebrafisch: Connaughton et al., 2004; Song et al., 2008). Synaptische Kontakte der Axone zu den Perikarya von Bipolaren (Goldfisch: Marshak & Dowling, 1987) oder zu den Stäbchen, wie bei höheren Vertebrata (Tigersalamander: Zhang et al., 2006; Huhn: Edqvist et al., 2008; Primat: Kolb, 1970; Puller & Haverkamp, 2009) konnten bei der Sardelle nicht entdeckt werden.

Bipolarzellen

Durch die neue Methode des FIB-FESEM wurde die erste neuroanatomische Darstellung von vollständigen Bipolaren der Sardellenretina möglich (Heß, 2000: nur Dendritenbäumchen), sowohl in EM-Qualität als auch in einem manipulierbaren, dreidimensionalen Modell. Zu jeder individuellen Zelle lassen sich OPL-Konnektivität (s.u.), IPL-Terminationstiefen und IPL-Konnektivität (s.u.) im Prinzip feststellen, sowie die Gestalt und Ausdehnung des Dendri-

tenbäumchens (sofern komplett im Volumen). Gegenüber bisherigen Versuchen der TEM-3D-Rekonstruktion von Bipolarzellen oder ihrer Terminalen bei Vertebraten (Cohen & Sterling, 1990; Strettoi et al., 1990) ergeben sich neue Möglichkeiten der Analyse, wenn auch die (xy-)Auflösung vergleichsweise beschränkt bleibt.

Es wurden für *E. encrasicolus* neun morphologisch unterschiedliche Bipolartypen definiert, die sich nach der Kernposition in der INL, Axondicke, Gestalt der Axonterminalen, sowie Terminationstiefe in ON/OFF-Schicht der IPL (z.B. Nelson et al., 1978) klassifizieren lassen. Dabei fällt auf, dass die OFF-Bipolaren weiter verzweigte Axonterminalen ausbilden als die ON-Bipolaren, die meist in einer \pm knotig-runden Verdickung enden (s.a. Goldfisch: Connaughton et al., 2004). Nach ähnlichen Kriterien wurden auch Bipolartypen anderer Teleostei klassifiziert (s. Tab. 3.4.3). In der Regel werden dabei die Zellen mit den größten Somata und Axonterminalen, den dicksten Primärdendriten und Axonen, sowie der dichtesten dendritischen Arborisation als Stäbchen-Bipolaren identifiziert (Ramón y Cajal, 1892; Scholes, 1975; Connaughton et al., 2004), die bei Teleostei hauptsächlich Stäbchen-Kontakte aber auch (Rot)zapfen-Kontakte ausbilden (z.B. Goldfisch: Stell, 1967; Rotfeder: Scholes, 1975). Dieser Zelltyp endet in einer voluminösen, \pm kugeligen Terminale tief in der IPL und entspricht bei *E. encrasicolus* (wahrscheinlich) dem Bipolartyp 8, der zahlreiche Kontakte zu Stäbchen und langen Zapfen ausbildet. Er kann z.B. mit B1 der Bastardmakrele (Podugolnikova, 1985) oder B_{on}-s6L beim Zebrafisch (Connaughton et al., 2004) homologisiert werden. Verzweigte OFF-terminierende Bipolaren, sowie bistratifizierte und tief in der IPL terminierende Bipolaren, finden sich auch z.B. bei der Rotfeder (Typ a, b: Scholes, 1975: fig. 39) oder beim Goldfisch (Typ C1aW, C2ab: Sherry & Yazulla, 1993). Eine Übersicht über weitere homologisierbare Bipolartypen anderer Teleostei gibt Tabelle 3.4.3. Eine weiterführende, rein morphologische Korrelation der hier identifizierten Bipolartypen mit denen anderer Teleostei fällt schwer, da es keine speziesübergreifende, konsistente Einteilung der IPL-Substrata gibt und durchaus merkliche interspezifische Unterschiede in der Neuroanatomie festzustellen sind.

Da für die Sardelle teilweise mehrere Zellen eines Bipolartyps rekonstruiert werden konnten, lassen sich Muster von Axonterminalen und dendritische Felder genauer untersuchen. Letztere können innerhalb eines Typs leicht überlappen, d.h. zwei Zellen desselben Typs kontaktieren gelegentlich denselben Zapfen (vgl. Abb. 3.4.9).

In *E. encrasicolus* können synaptische Ribbons nicht nur in den aufgeschwollenen Axonterminalen der Bipolaren (Witkovsky & Stell, 1973; Haesendonck & Missotten, 1983b; Strettoi et al., 1990), sondern auch entlang ihrer Axone gefunden werden.

Tabelle 3.4.3 Übersicht über homologisierbare Bipolartypen bei *E. encrasicolus* und anderen Teleostei.

Autor	Untersuchte Spezies	Anzahl Bipolartypen	Homologien Literatur/ <i>E. encrasicolus</i>
Scholes, 1975	Rotfeder <i>Scardinius erythrophthalmus</i>	mehrere	Typ a/B4, Typ b/B9, N.N./B8
Sherry & Yazulla, 1993	Goldfisch <i>Carrasius auratus</i>	15	Mb1/B8, Mb2/B7, Mb3/B9, Ma/B1, C1aW/B4
Podugolnikova, 1985	Bastardmakrele <i>Trachurus mediterraneus ponticus</i>	8	B1/B8, B6/B9
Connaughton et al., 2004	Zebrafisch <i>Danio rerio</i>	17	B _{on} -s6L/B8

Müllerzellen

Klare Vorstellungen von der dreidimensionalen Struktur einer Müllerzelle finden sich bereits bei Newman & Reichenbach (1996: fig. 1), ein erstes hochaufgelöstes 3D-Modell von Müllerzellen wird in der vorliegenden Arbeit für die Sardelle präsentiert. Da sie den Raum zwischen den Somata der Sekundärneuronen weitverzweigt ausfüllen, erscheinen Müllerzellen in lichtmikroskopischer Auflösung meist unscharf (z.B. Mack et al., 1998; Bringmann et al., 2006). Für *E. encrasicolus* konnte ein klares Bild von Form, Raumerfüllung und Anzahl der Müllerzellen in der INL gegeben werden, was im Wesentlichen dem anderer Vertebraten entspricht (Mack et al., 1998; Mack, 2007; Reichenbach et al., 1993, 1994; Burris et al., 2002; Bringmann et al., 2006). Elektronenmikroskopisch unterscheiden sich die Müllerzellen durch ihr elektronendichtes, tubuläres Cytoplasma deutlich von den umgebenden Sekundärneuronen (vgl. Abb. 3.4.11 E, F; Abb. 3.4.5 C). Eine Stratifikation und Separation der Horizontalzellen ist innerhalb der Knochenfische üblich, ein mächtiges Doppelband aus Müllerfasern findet sich in der näheren Verwandtschaft von *E. encrasicolus*, bei *Lycothrissa crocodilus*, *Stolephorus indicus*, *Encrasicholina heteroloba*, *Lycengraulis batesii* und *Anchoviella* sp. (vgl. Heß, 2000). Andeutungsweise kann es auch für andere Fische, z.B. *Catostomus catostomus* (Ali & Ancil, 1976) oder *Roccus crysops* (Vaughan & Lasater, 1990) erkannt werden.

Amakrinen

Im Probevolumen wurden insgesamt 31 Amakrinen erkannt, davon 14 mit dem größten Zellanteil im Volumen rekonstruiert. Sie nehmen eine vitreale Lage in der INL ein und haben deutlich größere Kerne und Somata als Bipolaren. Aufgrund von Kern- und Cytoplasmastruktur können drei Großklassen eingeteilt werden, die durch den 3D-Aspekt in zahlreiche Subtypen unterteilt werden. Durch die Limitierung des Probevolumens sind nur ein bis zwei

Amakrinen \pm vollständig darstellbar, aus denen sich ein brauchbares Bild der Dendritenbäumchen ergibt. Ähnlich wie beim Zebrafisch (Connaughton et al., 2004) kann eine Einteilung der Amakrinen in ON/OFF-Amakrinen bzw. diffus/geordnet terminierende Amakrinen erfolgen (vgl. Abb. 3.4.12 B, C). Die Neuroanatomie der Zebrafisch-Amakrinen A_{on-s4} und A_{on-s5} (Connaughton et al., 2004: fig. 7 D, E) ähnelt der eines Amakrinentyps 2 bei *E. encrasicolus* (Abb. 3.4.12 C), die Terminationsebenen unterscheiden sich allerdings deutlich. Es sind erste Aussagen zur Kostratifizierung bzw. Konnektivität mit Bipolaren möglich (s. Abb. 3.4.10 A), für eine eindeutige Darstellung der Synapsen ist weiterhin die Überprüfung am TEM erforderlich (höhere xy-Auflösung!).

Ganglienzellen

Aufgrund der Größe der Ganglienzellen sind im Probevolumen lediglich sieben Zellkerne teilweise enthalten, die Somata und Dendriten von sechs Ganglienzellen wurden – soweit im Volumen enthalten – rekonstruiert. Hier ist folglich das Bild der Neuroanatomie noch unvollständiger als bei Amakrinen, und es ist zu früh für Aussagen spezifischer Kostratifizierung bzw. Konnektivität. Dadurch ist bis jetzt auch noch keine funktionelle Diskussion für die Ganglienzellen möglich.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine detaillierte Neuroanatomie der Retinazellen aller Schichten in einem relativ großen Probevolumen mittels FIB-FESEM möglich ist, diese Methode aber auch an ihre Grenzen stößt. Für genaue feinstrukturelle Untersuchungen ist die xy-Auflösung teilweise zu gering und TEM-Aufnahmen mit deutlich besserer xy-Auflösung sind als Ergänzung nach wie vor sinnvoll. Hierbei hilft das Vorwissen aus der 3D-Rekonstruktion, um die Ultradünnschnittbilder eindeutig interpretieren zu können. Es konnte auch nur ein geringer Anteil der Neurite der IPL sinnvoll rekonstruiert werden, da der Großteil der Neurite von Somata außerhalb des Probevolumens kommt und nicht zugeordnet werden konnte. Für die großen Zellen der Retina (Amakrinen und Ganglienzellen) sind neuroanatomische Färbungen besser geeignet, um das gesamte dendritische Feld zu analysieren (z.B. Mikroinjektion: Dacey, 1990; Vaney, 1990; Golgi: Kolb & Nelson, 1981; Immunhistochemie: Haverkamp & Wässle, 2004; DiOlistic: Connaughton et al., 2004).

Erste Erkenntnisse zur **OPL-Konnektivität** der Sardellenretina

Die beliebige Komposition 3D-rekonstruierter, einzelner Neurone ermöglicht die Untersuchung der Zellkonnektivität für alle Zellen innerhalb des VOI (*volume of interest*), was die Verschaltungsregeln und –geometrie der neuronalen Elemente analysierbar macht (Zusammenfassung aller bisher ermittelten OPL-Konnektivitäten Abb. 3.4.13). Die hier gelungene dreidimensionale Darstellung der H-Dendriten und ihrer Kontakte zu den Photorezeptoren in bisher unübertroffener Qualität (vgl. Heß et al., 2002) ermöglicht weitestgehend sichere Aussagen zu deren Konnektivität.

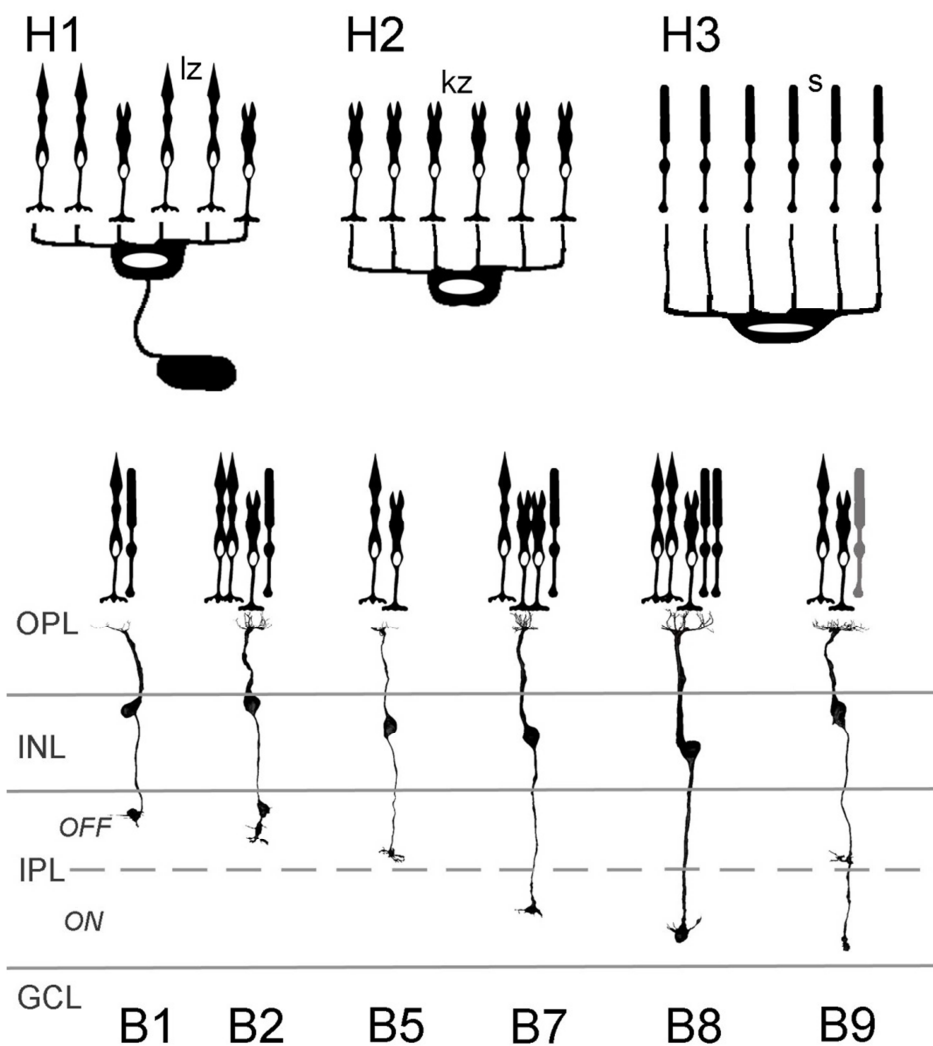


Abb. 3.4.13 Gesamtschema der Horizontalzell- (H1–3) und Bipolar-Konnektivitäten (B1–B9) in der Sardellenretina.

kz (kurzer Zapfen), **lz** (langer Zapfen), **s** (Stäbchen).

Bevorzugte Ausbildung von synaptischen Kontakten wird über die Anzahl der Photorezeptorpiktogramme ausgedrückt, unsichere Kontakte sind ausgegraut.

Dies gelang bisher in kleinerem Maße (einzelne Pedicles mit einzelnen markierten H-Zellen) über Golgi-Färbung und anschließender Ultradünnschnittserie der gefärbten Zelle (z.B. Stell et al., 1975; Downing & Djamgoz, 1989). Das prinzipielle H-Konnektivitätsmuster der Sardelle (Abb. 3.4.13) entspricht dem anderer Teleostei: die skleral gelegenen H-Zellen kontaktieren Zapfen, die vitreale H-Zelllage die Stäbchen (Stell, 1967; Stell & Lightfoot, 1975; Parthe, 1981; Song et al., 2008). Eine Korrelation des Zapfen-H-Konnektivitätsmuster der Sardelle mit dem farbsehender Fische ist möglich (vgl. Abb. 3.4.14): beim Goldfisch, der 3 zapfenspezifische H-Zelltypen aufweist, bilden die H1 vorwiegend Kontakte zu Rotzapfen, aber auch zu Grün- und Blauzapfen aus, die H2 bevorzugen Grünzapfen, kontaktieren aber auch Blauzapfen, und die H3 kontaktieren ausschließlich die Blauzapfen (Stell et al., 1975; s. auch Abb. 3.4.13). Unter der Annahme dass sich das Polarisationskontrastsehen aus dem Farbsehsystem entwickelt hat und dass *E. encrasicolus* in weiten Teilen ihrer Retina die Blauzapfen (short single cones) „verloren“ hat (Ausnahme Triple-Cone-Region, Heß, 2009; Kondrashev et al., 2011), könnten sich die langen Zapfen aus den Rotzapfen und die kurzen aus den Grünzapfen entwickelt haben.

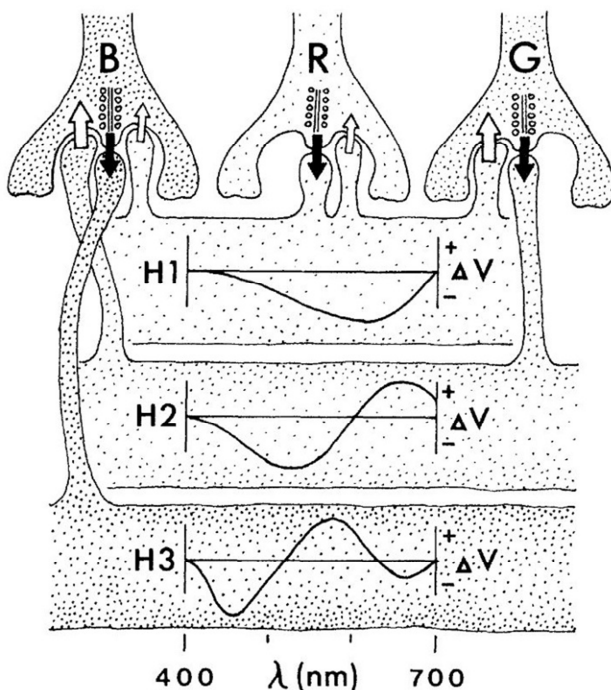


Abb. 3.4.14 Schematische Darstellung der Signalwege der Zapfenhorizontalen in der Goldfischretina
(aus Stell et al., 1975).

B (Blauzapfen), **G** (Grünzapfen), **H1–3** (Horizontalzelltypen 1–3), **R** (Rotzapfen).

Da sich Polarisationskontrastsehen und Farbkontrastsehen gegenseitig ausschließen (Bernard & Wehner, 1977; Wehner & Bernard, 1993), haben die Zapfen der Sardelle ihre verschiedenen Opsine eingebüßt (Novales Flamarique & Harosi, 2002) bzw. haben nun das gleiche Absorptionsspektrum. Auch die geringeren Unterschiede (Austausch von Aminosäuren im Proteinanteil) zwischen Rot- und Grün-Opsin gegenüber dem Blauopsin unterstützen die Hypothese vom Verlust der Blauzapfen (siehe z.B. Referenzen in Weadick & Chang, 2007). Unterschiedliche Positionen der H-Zelldendriten am synaptischen Zapfenribbon (laterale oder zentrale) und daraus entstehende unterschiedliche Informationsflüsse (prä- oder postsynaptisch) wie beim Goldfisch (Stell, 1975; Stell et al., 1975) konnten bei der Sardelle nicht entdeckt werden. Den Horizontalzellen kommt wahrscheinlich beim Polarisationskontrastsehen eine ähnliche Bedeutung wie beim Farbsehen zu (Svaetichin, 1967; Wagner, 1972).

Die unterschiedlichen Bipolartypen mit unterschiedlichen Konnektivitätsmustern führen zu der Annahme, dass Parallelprozessierung unterschiedlicher Informationsanteile erfolgt (Review in Wässle, 2004). Die Trennung der Polarisationskanäle ist bei der Sardelle offenbar nicht 100%ig scharf, es sind bestimmte Zapfenpräferenzen sichtbar, aber die Bipolartypen bilden nicht ausschließlich synaptische Kontakte zu jeweils einem Zapfentyp aus (vgl. Abb. 3.4.13). Große dendritische Felder bedeuten hohe Konvergenz, wie sie z.B. für Bipolartypen 8 und 9 zu finden ist. Bipolartypen mit hauptsächlichem Zapfenkontakt zeigen in der hier untersuchten Area temporalis erwartungsgemäß relativ kleine dendritische Felder und somit geringere Konvergenz (z.B. Bipolartypen 2, 5, 7; vgl. Abb. 3.4.9). Die im Probevolumen besonders häufig gefundenen Bipolartypen mit relativ kleinen dendritischen Feldern (Typen 2, 5, 7) scheinen eine besondere Rolle beim räumlich hochauflösenden Sehen zu spielen und haben regelmäßig angeordnete Axonterminalen (s.a. Podugolnikova, 1985). Angenommen, dass jeder Zapfentyp mit jeweils einer spezifischen ON- und OFF-Bipolare synaptisch verbunden ist, könnte Bipolartyp 8 „*langer Zapfen ON*“, Typ 2 „*langer Zapfen OFF*“, Typ 7 „*kurzer Zapfen ON*“ und Typ 5 evtl. „*kurzer Zapfen OFF*“ sein.

Erste Erkenntnisse zur IPL-Konnektivität der Sardellenretina

Die IPL ist in der Area temporalis eine mächtige Schicht, in der Verschaltung von Bipolaren mit Amakrinen und Ganglienzellen stattfindet. Bipolar-Bipolar-Kontakte (z.B. Witkovsky & Stell, 1973; Haesendonck & Missotten, 1983a, b; Umino et al., 1994) sind bei der Sardelle durch aufeinander zustrebende laterale Fortsätze und direkten räumlichen Kontakt zu erkennen (zwischen Zellen des gleichen Typs, besonders auffällig bei Typ 2, 3, 7 und 9). An den zahlreichen Ribbon-Synapsen der Bipolaren sind Diaden erkennbar. Da nur ein geringer Teil der Neurite der IPL im Probevolumen einem bestimmten Zelltyp sicher zugeordnet werden konnte, kann die Zugehörigkeit der Diaden-Elemente zu Amakrinen nur vermutet werden

(Witkovsky & Dowling, 1969). Durch das generierte 3D-Modell werden Kostratifizierungen und daraus resultierende synaptische Kontakte von Bipolaren und Amakrinen sichtbar (s. Abb. 3.4.10 A, B), müssen aber mit weiteren elektronenmikroskopischen Untersuchungen in höherer xy-Auflösung (TEM!) verifiziert werden. Dies gilt auch für die in Ansätzen erkennbaren synaptischen Verbindungen von Ganglienzellen und Bipolaren (Witkovsky & Dowling, 1969). Terminalendichte und –muster bei Typ 2, 7 und evtl. 9 sprechen für die Beteiligung am hochauflösenden Sehen.

Das Bild der Verschaltungen in der IPL bleibt nach wie vor unvollständig, allerdings können bei zahlreichen Zelltypen die funktionelle Bedeutung (ON/OFF), sowie die grundsätzliche Kanaltrennung (unterschiedliche Konnektivitätsmuster), Konvergenz und Kostratifikation erkannt werden.

Literatur

- Ahnelt PK & Kolb H (1994a). Horizontal cells and cone photoreceptors in primate retina: A Golgi-light microscopic study of spectral connectivity. *Journal of Comparative Neurology* 343: 387–405.
- Ahnelt PK & Kolb H (1994b). Horizontal cells and cone photoreceptors in human retina: A Golgi-electron microscopic study of spectral connectivity. *Journal of Comparative Neurology* 343: 406–427.
- Ali MA & Anctil M (1976). Retinas of fishes – an atlas. *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York*. 294 S.
- Ammermüller J & Kolb H (1996). Functional architecture of the turtle retina. *Progress in Retinal and Eye Research* 15: 393–433.
- Bernard GD & Wehner R (1977). Functional similarities between polarization vision and color vision. *Vision Research* 17: 1019–1028.
- Boycott BB & Wässle H (1991). Morphological classification of bipolar cells of the primate retina. *European Journal of Neuroscience* 3: 1069–1088.
- Briggman KL, Helmstaedter M & Denk W (2011). Wiring specificity in the direction-selectivity circuit of the retina. *Nature* 471: 183–188.
- Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN & Reichenbach A (2006). Müller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in Retinal and Eye Research* 25: 397–424.
- Burris C, Klug K, Ngo IT, Sterling P & Schein S (2002). How Müller glial cells in macaque fovea coat and isolate the synaptic terminals of cone photoreceptors. *Journal of Comparative Neurology* 453: 100–111.
- Cohen AI (1965). Some electron microscopic observations on interreceptor contacts in the human and macaque retina. *Journal of Anatomy, London* 99: 595–610.

- Cohen E & Sterling P (1990). Demonstration of cell types among cone bipolar neurons of cat retina. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 330: 305–321.
- Connaughton VP, Graham D & Nelson R (2004). Identification and morphological classification of horizontal, bipolar, and amacrine cells within the zebrafish retina. *Journal of Comparative Neurology* 477: 371–385.
- Cuenca N, Deng P, Linberg KA, Lewis GP, Fisher SK & Kolb H (2002). The neurons of the ground squirrel retina as revealed by immunostains for calcium binding proteins and neurotransmitters. *Journal of Neurocytology* 31: 649–666.
- Dacey DM (1990). The dopaminergic amacrine cell. *Journal of Comparative Neurology* 301: 461–489.
- Dowling JE, Pak MW & Lasater EM (1985). White perch horizontal cells in culture: methods, morphology and process growth. *Brain Research* 360: 331–338.
- Downing JEG & Djamgoz MBA (1989). Quantitative analysis of cone photoreceptor-horizontal cell connectivity patterns in the retina of a cyprinid fish: Electron microscopy of functionally identified and HRP-labelled horizontal cells. *Journal of Comparative Neurology* 289: 537–553.
- Edqvist PHD, Lek M, Boije H, Lindbäck SM & Hallböök F (2008). Axonbearing and axon-less horizontal cell subtypes are generated consecutively during chick retinal development from progenitors that are sensitive to follistatin. *BMC Developmental Biology* 8: 46.
- Famiglietti E (2008). Wide-field cone bipolar cells and the blue-ON pathway to color-coded ganglion cells in rabbit retina. *Visual Neuroscience* 25: 53–66.
- Gan WB, Grutzendler J, Wong WT, Wong ROL & Lichtman JW (2000). Multicolor “DiOlistic” labeling of the nervous system using lipophilic dye combinations. *Neuron* 2: 219–225.
- Haesendonck E, van & Missotten L (1983a). Stratification and square pattern arrangements in the dorsal inner plexiform layer in the retina of *Callionymus lyra* L. *Journal of Ultrastructure Research* 83: 296–302.
- Haesendonck E, van & Missotten L (1983b). Interbipolar contacts in the dorsal inner plexiform layer in the retina of *Callionymus lyra* L. *Journal of Ultrastructure Research* 83: 303–311.
- Haesendonck E, van & Missotten L (1984). Synaptic contacts between bipolar and photoreceptor cells in the retina of *Callionymus lyra* L. *Journal of Comparative Neurology* 223: 387–399.
- Haverkamp S, Ghosh K, Hirano A & Wässle H (2003). Immunocytochemical description of five bipolar cell types of the mouse retina. *Journal of Comparative Neurology* 455: 463–476.
- Haverkamp S & Wässle H (2000). Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *Journal of Comparative Neurology* 424: 1–23.
- Haverkamp S & Wässle H (2004). Characterization of an amacrine cell type of the mammalian retina immunoreactive for vesicular glutamate transporter 3. *Journal of Comparative Neurology* 468: 251–63.
- Heß M (2000). Vergleichend feinstrukturelle Untersuchungen an der Netzhaut der Europäischen Sardelle *Engraulis encrasicolus* L. (Engraulidae) und den Retinae anderer Clupeiformes. *Dissertation an der Fakultät für Biologie, LMU München*.

- Heß M (2009). Triple cones in the retinae of three anchovy species: *Engraulis encrasicolus*, *Cetengraulis mysticetus* and *Anchovia macrolepidota* (Engraulidae, Teleostei). *Vision Research* 49: 1569–1582.
- Heß M, Melzer RR, Eser R & Smola U (2006). The structure of anchovy outer retinae (Engraulidae, Clupeiformes) – A comparative light- and electron-microscopic study using museum-stored material. *Journal of Morphology* 267: 1356–1380.
- Heß M, Melzer RR & Smola U (2002). The pattern of cone pedicles and horizontal cells in the retina of the European anchovy, *Engraulis encrasicolus* L. (Engraulidae, Clupeiformes). *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 34: 355–365.
- Hidaka S, Christensen BN & Naka KI (1986). The synaptic ultrastructure in the outer plexiform layer of the catfish retina: a three-dimensional study with HVEM and conventional EM of Golgi-impregnated bipolar and horizontal cells. *Comparative Neurology* 247: 181–199.
- Jastrow H. Electron microscopic atlas of cells, tissues and organs in the internet.
<http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/EMHRetinaE.html>
- Kaneko A (1971). Electrical connexions between horizontal cells in the dogfish retina. *Journal of Comparative Physiology* 56: 137–160.
- Kaneko A (1973). Receptive field organization of bipolar and amacrine cells in the goldfish retina. *Journal of Physiology* 235: 133–153.
- Kaneko A & Yamada M (1972). S-potentials in the dark-adapted retina of the carp. *Journal of Physiology* 227: 261–273.
- Koch PC & Heß M (2011). Topographic mapping of retinal neurons in the European anchovy by nuclear staining and immunohistochemistry. *Journal of Neuroscience Research* 89: 1316–1330.
- Kolb H (1970). Organization of the outer plexiform layer of the primate retina: Electron microscopy of Golgi-impregnated cell. *Philosophical Transactions of the Royal Society London. Series B, Biological Sciences* 258: 261–283.
- Kolb H & Dekorver L (1991). Midget ganglion cells of the parafovea of the human retina: A study by electron microscopy and serial section reconstructions. *Journal of Comparative Neurology* 303: 617–636.
- Kolb H & Jones J (1985). Electron microscopy of Golgi-impregnated photoreceptors reveals connections between red and green cones in the turtle retina. *Journal of Neurophysiology* 54: 304–317.
- Kolb H, Linberg KA & Fisher SK (1992). Neurons of the human retina: A Golgi study. *Journal of Comparative Neurology* 318: 147–187.
- Kolb H & Nelson R (1981). Amacrine cells, bipolar cells and ganglion cells of the cat retina: A Golgi study. *Vision Research* 21: 1081–1114.
- Kolb H & Nelson R (1984). Neural architecture of the cat retina. *Progress in Retinal Research* 3: 21–60.
- Kondrashev SL, Gnyubkina VP, Zueva LV & Govardovskii VI (2011). Retinal specialization for polarization and colour vision in two species of anchovies (Engraulidae, Clupeiformes). *European Retina Meeting 2011 (Amsterdam)*, abstract book: S. 64.

- Lasansky A (1972). Cell junctions at the outer synaptic layer of the retina. *Investigative Ophthalmology* 11: 265–274.
- Lee BB, Martin PR & Grünert U (2010). Retinal connectivity and primate vision. *Progress in Retinal and Eye Research* 29: 622–639.
- Linberg KA, Suemune S & Fisher SK (1996). Retinal neurons of the Californian ground squirrel, *Spermophilus beecheyi*: A Golgi study. *Journal of Comparative Neurology* 365: 173–216.
- Linser PJ, Smith K & Angelides K (1985). A comparative analysis of glial and neuronal markers in the retina of fish: variable character of horizontal cells. *Journal of Comparative Neurology* 237: 264–272.
- Mack AF (2007). Evidence for a columnar organization of cones, Müller cells, and neurons in the retina of a cichlid fish. *Neuroscience* 144: 1004–1014.
- Mack AF, Germer A, Janke C & Reichenbach A (1998). Müller (glial) cells in the teleost retina: Consequences of continuous growth. *Glia* 22: 306–313.
- MacNeil MA, Heussy JK, Dacheux RF, Raviola E & Masland RH (1999). The shapes and numbers of amacrine cells: Matching of photofilled with Golgi-stained cells in the rabbit retina and comparison with other mammalian species. *Journal of Comparative Neurology* 413: 305–326.
- Marshak DW & Dowling JE (1987). Synapses of cone horizontal cell axons in goldfish retina. *Journal of Comparative Neurology* 256: 430–443.
- Missotten L (1966). The ultrastructure of the human retina. *Arschia Uitgaven, Brüssel*. 184 S.
- Nelson R, Famiglietti EV & Kolb H (1978). Intracellular staining reveals different levels of stratification for on- and off-center ganglion cells in the cat retina. *Journal of Neurophysiology* 41: 472–483.
- Newman E & Reichenbach A (1996). The Müller cells: A functional element of the retina. *Trends in Neuroscience* 19: 307–312.
- Nilsson SEG (1964). Interreceptor contacts in the retina of the frog (*Rana pipiens*). *Journal of Ultrastructure Research* 11: 147–165.
- Novales Flamarique I & Harosi FI (2002). Visual pigments and dichroism of anchovy cones: A model system for polarization detection. *Visual Neuroscience* 19: 467–473.
- Parthe V (1972). Horizontal, bipolar and oligopolar cells in the teleost retina. *Vision Research* 12: 395–398.
- Parthe V (1981). Horizontal cell processes in teleost retina. *Journal of Neuroscience Research* 6: 113–118.
- Podugolnikova TA (1985). Morphology of bipolar cells and their participation in spatial organization of the inner plexiform layer of jack mackerel retina. *Vision Research* 25: 1843–1851.
- Puller C & Haverkamp S (2009). Die synaptische Architektur des Zapfen-Endfüßchens. *Neuroforum* 4/09: 114–123.
- Ramón y Cajal S (1892). La rétine des vertébrés. *La Cellule* 9: 121–257.
- Reichenbach A, Stolzenburg JU, Eberhardt W, Chao TI, Dettmer D & Hertz L (1993). What do retinal Müller (glial) cells do for their neuronal „small siblings“? *Journal of Chemical Neuroanatomy* 6: 201–213.

- Reichenbach A, Ziegert M, Schnitzer J, Pritz-Hohmeier S, Schaaf P, Schober W & Schneider H (1994). Development of the rabbit retina. V. The question of 'columnar units'. *Developmental Brain Research* 79: 72–84.
- Revel JP & Karnovsky MJ (1967). Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *Journal of Cell Biology* 33: C7–C12.
- Rodieck RW & Brening RK (1983). Retinal ganglion cells: properties, types, genera, pathways and trans-species comparisons. *Brain, Behavior and Evolution* 23: 121–164.
- Saito T, Kondo H & Toyoda JI (1978). Rod and cone signals in the on-center bipolar cell: Their different ionic mechanisms. *Vision Research* 18: 591–595.
- Scholes JH (1975). Colour receptors, and their synaptic connexions, in the retina of a cyprinid fish. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 270: 61–118.
- Scholes JH & Morris J (1972). Receptor-bipolar connectivity patterns in fish retina. *Nature* 241: 52–54.
- Selvin de Testa A (1966). Morphological studies on the horizontal and amacrine cells of the teleost retina. *Vision Research* 6: 51–52.
- Sherry DM & Yazulla S (1993). GABA and glycine in retinal amacrine cells: Combined Golgi impregnation and immunocytochemistry. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 342: 295–320.
- Sjöstrand FS (1969). The outer plexiform layer and the neural organization of the retina. In: Straatsma BR, Hall MO, Allen RA & Crescitelli F (eds): The retina: Morphology, function and clinical characteristics. UCLA forum in medical sciences 8. *University of California Press, Berkeley, Los Angeles*. S. 63–100.
- Song PI, Matsui JI & Dowling JE (2008). Morphological types and connectivity of horizontal cells found in the adult zebrafish (*Danio rerio*) retina. *Journal of Comparative Neurology* 506: 328–338.
- Stell WK (1967). The structure and relationships of horizontal cells and photoreceptor-bipolar synaptic complexes in goldfish retina. *American Journal of Anatomy* 121: 401–423.
- Stell WK (1975). Horizontal cell axons and axon terminals in goldfish retina. *Journal of Comparative Neurology* 159: 503–520.
- Stell WK, Ishida AT & Lightfoot DO (1977). Structural basis for on- and off-center responses in retinal bipolar cells. *Science* 198: 1269–1271.
- Stell WK & Lightfoot DO (1975). Color-specific interconnections of cones and horizontal cells in the retina of the goldfish. *Journal of Comparative Neurology* 159: 473–502.
- Stell WK, Lightfoot DO, Wheeler TG & Leeper HF (1975). Goldfish retina: Functional polarization of cone horizontal cell dendrites and synapses. *Science* 190: 989–990.
- Sterling P (1982). Identified neurons in the cat retina. In: Morrison AR & Strick PL (eds): Changing concepts of the nervous system. *Academic Press, New York*. S. 281–293.
- Sterling P (1983). Microcircuitry of the cat retina. *Annual Review of Neuroscience* 6: 149–185.
- Strettoi E, Dacheux RF & Raviola E (1990). Connections of rod bipolar cells in the inner plexiform layer of the rabbit retina. *Journal of Comparative Neurology* 295: 449–466.
- Svaetichin G (1967). Horizontal and amacrine cells of the retina – properties and mechanisms of their control upon bipolar and ganglion cells. *Acta Cientifica Venezolana Suppl.* 3: 254–276.

- Thévenaz P, Ruttimann UE & Unser M (1998). A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. *IEEE Transaction on Image Processing* 7: 27-41.
- Tsukamoto Y, Masarachia P, Schein SJ & Sterling P (1992). Gap junctions between the pedicles of macaque foveal cones. *Vision Research* 32: 1809–1815.
- Umino O, Maehara M, Hidaka S, Kita S & Hashimoto Y (1994). The network properties of bipolar–bipolar cell coupling in the retina of teleost fishes. *Visual Neuroscience* 11: 533–548.
- Vaney DI (1990). The mosaic of amacrine cells in the mammalian retina. *Progress in Retinal Research* 9: 49–100.
- Vaughan DK & Lasater EM (1990). Glial and neuronal markers in bass retinal horizontal and Müller cells. *Brain Research* 537: 131–140.
- Wässle H (2004). Parallel processing in the mammalian retina. *Nature Reviews Neuroscience* 5: 747–757.
- Wässle H, Puller C, Müller F & Haverkamp S (2009). Cone contacts, mosaics, and territories of bipolar cells in the mouse retina. *Journal of Neuroscience* 29: 106-117.
- Wagner HJ (1972). Vergleichende Untersuchungen über das Muster der Sehzellen und Horizontalen in der Teleostierretina (Pisces). *Zeitschrift für Morphologie der Tiere* 72: 77–130.
- Wagner HJ (1976). The connectivity of cones and cone horizontal cells in a mosaic type teleost retina. *Cell and Tissue Research* 175: 85–100.
- Wagner HJ & Wagner E (1988). Amacrine cells in the retina of a teleost fish, the roach (*Rutilus rutilus*): A Golgi study on differentiation and layering. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 321: 263–324.
- Weadick CJ & Chang BSW (2007). Long-wavelength sensitive visual pigments of the guppy (*Poecilia reticulata*): Six opsins expressed in a single individual. *BMC Evolutionary Biology* 7 (Suppl 1): S11.
- Weiler R (1978). Horizontal cells of the carp retina – Golgi impregnation and Procion-yellow injection. *Cell and Tissue Research* 195: 515–526.
- Wehner R & Bernard GD (1993). Photoreceptor twist: A solution to the false-color problem. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90: 4132–4135.
- Witkovsky P & Dowling JE (1969). Synaptic relationships in the plexiform layers of carp retina. *Cell and Tissue Research* 100: 60–82.
- Witkovsky P & Stell WK (1973). Retinal structure in the smooth dogfish *Mustelus canis*: Electron microscopy of serially sectioned bipolar cell synaptic terminals. *Journal of Comparative Neurology* 150: 147–148.
- Zhang AJ, Zhang J & Wu SM (2006). Electrical coupling, receptive fields, and relative rod/cone inputs of horizontal cells in the tiger salamander retina. *Journal of Comparative Neurology* 499: 422–431.

4 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit liefert in einem methodisch vielseitigen Ansatz zahlreiche neue Strukturdaten zum Aufbau der inneren Retina bei der Europäischen Sardelle *Engraulis encrasicolus* in licht- und elektronenmikroskopischer Auflösung und durchwegs unter Berücksichtigung der dreidimensionalen Natur des Gewebes.

Detaildiskussionen unter Berücksichtigung der Primärliteratur finden sich jeweils am Ende der Manuskripte/Publicationen 3.1–3.4. An dieser Stelle folgt eine kurze methodenübergreifende und –vergleichende Diskussion.

Mit den durchgeführten Studien wurden **neue Darstellungs- und Analysemethoden** etabliert (3D-Kernkartierung, Korrelationskarten), sowie die **neue Methode der FIB-FESEM** erstmals auf die Vertebratenretina angewandt, womit interaktive 3D-Modelle in 10 nm isotropischer Auflösung und vollständige Erfassung aller Neurone eines VOI ohne selektive Markierung erstmals möglich wurden. Die Generierung eines großen Datenstapels aus mehreren Teilstapeln über einen langen Zeitraum war einerseits mit Schwierigkeiten behaftet, konnte aber auch wertvolle Informationen zur Etablierung und Kalibrierung dieser neuen Methode und des Gerätes im Hause beisteuern. Die Vorteile der 3D-Rekonstruktion bzgl. der Visualisierung und des Erkenntnisgewinns liegen auf der Hand: (1) 3D-Darstellung in vorteilhafter Perspektive, (2) breites Dimensionsspektrum von Gesamtzellansicht bis Synapsendetail und (3) freie Wählbarkeit der dargestellten Zellen/Zelltypen für die Beurteilung von Terminationstiefen, synaptischen Kontakten, der Ausdehnung dendritischer Felder und von Kostratifizierungen, was bisher nicht oder nur in kleinen Ausschnitten möglich war.

Weiterhin wurden verschiedene Subpopulationen von Retinazellen klassifiziert, ausgezählt und kartiert, wobei Zellzahlverhältnisse grobe Aussagen zu konvergenten und divergenten Verschaltungen (und somit zu visuellen Eigenschaften wie Sehschärfe, Lichtempfindlichkeit etc.) zulassen. Die **Zelldichtekarten** der inneren Retina lassen einen deutlichen Bezug der meisten neuronalen Elemente zur Zapfendichteverteilung erkennen (s. Kapitel 3.2, 3.3). Ob die Dendritenbäumchen der Bipolaren in Form und Ausdehnung dem Polyconemuster folgen (z.B. polycone-parallele Dendritenkämme etc.), ließ sich im Rahmen dieser Arbeit noch nicht sicher feststellen (evtl. so bei Bipolartyp B8). Ebenso ließ sich die histologisch sichtbare Auftrennung in zwei Gruppen der synaptischen Kontakte/Ribbons im Pedicle des langen Zapfens (vgl. Kapitel 3.1) im dreidimensionalen Modell nicht nachvollziehen. In der inneren Retina finden sich (wenige) Elemente (wie bereits in 2.3 postuliert), die dem regelmäßigen

Reihenmuster der Zapfen folgen (z.B. Bipolarterminalen Typ B7). Es ist durchaus denkbar, dass vitreal der äußeren Grenzmembran (OLM) der Bezug zum regelmäßigen Photorezeptormuster absichtlich aufgegeben wird, um Aliasing-Effekte zu vermeiden (WK Stell, persönliche Mitteilung).

Erste **neuroanatomische Befunde** zur Sardellenretina ergeben sich aus Immunhistochemie und FIB-FESEM. Es wurden drei Horizontal- und (mindestens) neun Bipolarzelltypen identifiziert, wobei die Ergebnisse beider Methoden korreliert werden können: die PKC-positiven Bipolaren entsprechen rein morphologisch dem dreidimensional rekonstruierten Bipolartyp B8 (vgl. Abb. 3.4.7-B8 und Koch & Heß, 2011: fig. 1 B), die Parv_v-positiven Bipolaren könnten dem (nur teilweise rekonstruierbaren) Typ B6 entsprechen (vgl. Abb. 3.4.7-B6 und Koch & Heß, 2011: fig. 1 I) , evtl. sind die gelegentlich sichtbaren, schwach PKC-positiven Bipolaren mit Typ B7 korrelierbar. Immunfärbung mit Anti-Calretinin deutet darauf hin, dass die Schicht der Horizontalzell-Axonterminalen von H1 gebildet wird. FIB-FESEM bestätigt die Existenz der Axone und Axonterminalen grundsätzlich, aufgrund ihres teilweise lateralen Verlaufes, des begrenzten VOI und auftretender Störungen (Unschärfen, fehlende Schnittbilder) ist bisher nicht vollständig auszuschließen, dass auch H2 beteiligt sind.

Eine mögliche **Einteilung der IPL** in Substrata ergibt sich aus histologischen und neuroanatomischen Daten, die korrelierbar sind. Die dichteren bzw. weniger dichten Strata der IPL entsprechen jeweils feinen lateralen Verästelungen bzw. synaptischen Anschwellungen und lassen sich durch Korrelation der verschiedenen Methoden teilweise Bipolarzelltypen zuordnen (s. Abb. 4.1). Die lockeren und dichteren Horizonte der Substrata 1–3 werden von Bipolarzellen des Typs B1–3 gebildet, das Substratum 7 von den höchst regelmäßig angeordneten Axonterminalen des Bipolarzelltyps B7. Die großen Bipolarterminalen des Substrats 9 stammen vom Bipolarzelltyp B8. Bipolarzelltyp B9 bildet mit seinen lateralen Verästelungen zusammen mit den kostratifizierenden Amakrinen das dichte Geflecht des Substrats 4, seine knotigen Terminalen bilden das Substratum 10.

Es können erste verlässliche Aussagen zu **Verschaltungsregeln** in der Sardellenretina gemacht werden (s. Abb. 3.4.13). Interessant ist dabei, dass keine 100%ige Zelltypselektivität vorzuliegen scheint, es sind jedoch deutliche Kontaktpräferenzen zu bestimmten Photorezeptortypen sichtbar.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Methoden und Erkenntnisse erweitern und verfeinern das Bild der polarisationsempfindlichen Netzhaut der Sardelle erheblich. Dennoch ist der Weg zu einem mechanistischen Verständnis des Polarisationskontrastsehens noch weit. Weitere Fragen und Lösungsansätze für **zukünftige Forschungsprojekte** ergeben sich:

- Notwendigkeit der weiteren Auswertung des vorliegenden FIB-FESEM-Bilderstapels bzgl. Konnektivität (v.a. der Amakrinen und Ganglienzellen).
- Wiederholung und Verifizierung anhand von 3View®-Stacks (Heidelberger Hobel), um ein erheblich größeres VOI zu untersuchen (vollständige dendritische Felder von Amakrinen und Ganglienzellen!).
- Überprüfung (synaptischer) Details anhand von TEM-Bildern
- Untersuchung der Dreifachzapfenregion und/oder der Retina eines Knochenfisches mit nachgewiesenem Farbkontrastsehen; Vergleich der neuroanatomischen Befunde und Konnektivitäten.
- Ausweitung der neuroanatomischen Untersuchungen durch Anwendung weiterer Antikörper, Mikroinjektion (zahlreiche Vorversuche unternommen) und Golgi-Imprägnierung.

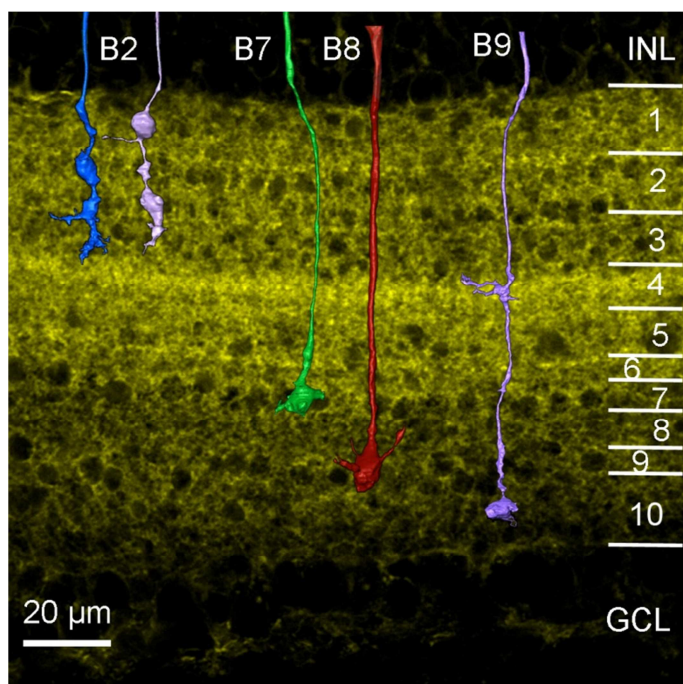


Abb. 4.1 Korrelation ausgesuchter 3D-rekonstruierter Bi-polarotypen mit der IPL-Schichtung (WGA-Färbung).

Um die Retina – als Teil des Gehirns – gänzlich zu verstehen wäre es notwendig, die synaptischen Verbindungen jedes einzelnen Neurons in einem großen oder sogar im ganzen Volumen darzustellen und zu untersuchen – ein nahezu unmögliches Unterfangen. Mit der Methode des FIB-FESEMs oder mit SBEM (serial-block-face EM/Heidelberger Hobel, s. Briggman et al., 2011) ist ein erster Schritt in diese Richtung gemacht.

5 DANK

Mein größter Dank gilt **PD Dr. Martin Heß** für die Ermöglichung und Betreuung dieses umfangreichen Forschungsprojektes. Sein Engagement in Forschung und Lehre ist beispiellos und sucht seinesgleichen. Seine fachlichen, sportlichen, sozialen, musikalischen und humoristischen Kompetenzen haben die gemeinsamen Jahre in der Arbeitsgruppe enorm bereichert. Ich danke für Tauch- und Bergwanderabenteuer, gemeinsame Exkursionen und Fachtagungen, Wies'ngemütlichkeit, G'stanzi und Witze in (un)passenden Momenten und Trost und Hilfe in allen Lebenslagen. Was die Zukunft bringt, weiß keiner, aber was die Wissenschaft zusammenschweißt, sollte der Arbeitsmarkt nicht trennen!

Herrn **Prof. Dr. Gerhard Haszprunar** möchte ich für die Bereitstellung der „Logistik“ in den Räumlichkeiten der Systematischen Zoologie danken, sowie für diverse Volksfest- und Abendessenseinladungen. An dieser Stelle auch großen Dank an seine beste aller Ehefrauen.

Heidemarie Gensler, die mich stets mit hervorragender Technischer Assistenz unterstützt hat, möchte ich für die umfangreiche und v.a. ganzheitliche Unterstützung in allen Lebensbereichen danken, sowie für Maifeuer, Wildschweinbraten, Tollwoodbesuche, Filmabende, Adlerfeder-Rituale und wertvolle Erfahrungsberichte aus ihrem ereignisreichen Leben.

Dr. Christian Seebacher gilt mein Dank für die Datenakquise am Zwei-Photonen-Mikroskop, **Prof. Dr. Gerhard Wanner** danke ich für die Datenakquise am FIB-FESEM.

Die restlichen Mitglieder und Alumni des **Haszi-Labs** verdienen Dank, weil's immer so nett war mit Euch: Elvira für die Rechtschreibkorrektur, Susi für die mecklenburgisch-bayerische Freundschaft, Thomas für Zitate aus Ovids Metamorphosen, Andi für kulinarische Köstlichkeiten, Max für Word-Tipps, Marc für gute Tischnachbarschaft, Sabine für lustige Schwänke aus ihrem Leben, Meli für gemeinsame Pausen, und und und...

Dr. Sandra Vengadasalam danke ich für die allerbeste studentische und darüberhinausgehende Freundschaft, sowie für musikalischen Ohrenschmaus und rauschende Bernheimer Feste!

David danke ich für die Angenehm-Gestaltung der nicht-wissenschaftlichen Seite meines Lebens.

6 LITERATUR

- Ali MA (1975). Vision in fishes – new approaches in research. *Plenum Press, New York*. 284 S.
- Ali MA & Heumann WR (1972). Distribution of vitamins A1 and A2 in the retinas of some marine fishes from the Gulf of California II. *Vision Research* 12: 2157–2159.
- Ali MA & Klyne MA (1985). Vision in vertebrates. *Plenum Press, New York, London*. 272 S.
- Awaiwanont K, Gunarso W, Sameshima M, Hayashi S & Kawamura G (2001). Grouped, stacked rods and tapeta lucida in the retina of Japanese anchovy *Engraulis japonicus*. *Fisheries Science* 67: 804–810.
- Bloomfield SA & Dacheux RF (2001). Rod vision: pathways and processing in the mammalian retina. *Progress in Retinal and Eye Research* 20: 351–384.
- Borisov PG & Protasov VP (1960). Some aspects of light perception in fish and selective light sources. *International Council for the Exploration of the Sea, Comparative Fishing Committee Paper* no. 139.
- Bowmaker JK & Kunz YW (1987). Ultraviolet receptors, tetrachromatic colour vision and retinal mosaics in brown trout (*Salmo trutta*): Age dependent changes. *Vision Research* 27: 2101–2108.
- Briggman KL, Helmstaedter M & Denk W (2011). Wiring specificity in the direction-selectivity circuit of the retina. *Nature* 471: 183–188.
- Browman HI & Hawryshyn CW (1992). Thyroxine induces a precocial loss of ultraviolet photosensitivity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vision Research* 32: 2303–2312.
- Cameron DA & Pugh EN jr. (1991). Double cones as a basis for a new type of polarization vision in vertebrates. *Nature* 353: 161–164.
- Davitz MA & McKaye KR (1978). Discrimination between horizontally and vertically polarised light by the cichlid fish *Pseudotropheus macropthalmus*. *Copeia* 2: 333–334.
- Denton EJ (1970). On the organisation of reflecting surfaces in some marine animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 258: 285–313.
- Denton EJ & Nicol JAC (1965). Polarization of light reflected from the silvery exterior of the bleak, *Alburnus alburnus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 45: 711–738.
- Fineran VA & Nicol JAC (1976). Novel cones in the retina of the anchovy (*Anchoa*). *Journal of Ultrastructure Research* 54: 296–303.
- Fineran VA & Nicol JAC (1977). Studies on the eyes of anchovies *Anchoa mitchilli* and *A. hepsetus* (Engraulidae) with particular reference to the pigment epithelium. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 276: 321–350.
- Fineran VA & Nicol JAC (1978). Studies on the photoreceptors of *Anchoa mitchilli* and *A. hepsetus* (Engraulidae) with particular reference to the cones. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 283: 25–60.
- Frisch K, von (1949). Die Polarisierung des Himmelslichtes als orientierender Faktor bei den Tänzen der Bienen. *Experientia* 5: 142–148.

- Haacke C, Heß M, Melzer RR, Gebhart H & Smola U (2001). Fine structure and development of the retina of the grenadier anchovy *Coilia nasus* (Engraulidae, Clupeiformes). *Journal of Morphology* 248: 41–55.
- Hawryshyn CW (1992). Polarization vision in fish. *American Scientist* 80: 164–175.
- Hawryshyn CW, Arnold MG, Bowering E & Cole RL (1990). Spatial orientation of rainbow trout to plane-polarized light: The ontogeny of e-vector discrimination and spectral sensitivity characteristics. *Journal of Comparative Physiology A* 166: 565–574.
- Hawryshyn CW & Bolder AE (1990). Spatial orientation of trout to partially polarized light. *Journal of Comparative Physiology A* 167: 691–697.
- Hawryshyn CW & McFarland WN (1987). Cone photoreceptor mechanisms and the detection of polarised-light in fish. *Journal of Comparative Physiology A*: 160: 459–465.
- Hawryshyn CW, Moyer HD, Allison WT, Haimberger TJ & McFarland WN (2003). Multidimensional polarisation sensitivity in damselfishes. *Journal of Comparative Physiology A* 189: 213–220.
- Heß M (2000). Vergleichend feinstrukturelle Untersuchungen an der Netzhaut der Europäischen Sardelle *Engraulis encrasicolus* L. (Engraulidae) und den Retinae anderer Clupeiformes. *Dissertation an der Fakultät für Biologie, LMU München*.
- Heß M (2007). Semi-automated mapping of cell nuclei in 3D-stacks from optical-sectioning microscopy. *Lecture Notes in Artificial Intelligence* 4826: 156–164.
- Heß M (2009). Triple cones in the retinae of three anchovy species: *Engraulis encrasicolus*, *Cetengraulis mysticetus* and *Anchovia macrolepidota* (Engraulidae, Teleostei). *Vision Research* 49: 1569–1582.
- Heß M, Melzer RR, Eser R & Smola U (2006). The structure of anchovy outer retinae (Engraulidae, Clupeiformes) – A comparative light- and electron-microscopic study using museum-stored material. *Journal of Morphology* 267: 1356–1380.
- Heß M, Melzer RR & Smola U (1998). Density map and patterns of cone photoreceptors in the retina of the European anchovy *Engraulis encrasicolus* L. (Engraulidae, Clupeiformes). *Zoology – Analysis of Complex Systems* 101, Suppl 1: 38.
- Heß M, Melzer RR & Smola U (2002). The pattern of cone pedicles and horizontal cells in the retina of the European anchovy, *Engraulis encrasicolus* L. (Engraulidae, Clupeiformes). *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 34: 355–365.
- Horváth G & Varjú D (1995). Underwater refraction-polarization patterns of skylight perceived by aquatic animals through Snell's window of the flat water surface. *Vision Research* 35: 1651–1666.
- Horváth G & Varjú D (2004). Polarized light in animal vision. *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York*. 470 S.
- Jerlov NG (1968). Optical oceanography. *Elsevier, Amsterdam*. 194 S.
- Kamermans M & Hawryshyn CW (2011). Teleost polarization vision: how it might work and what it might be good for. *Philosophical Transactions of the Royal Society London. Series B, Biological Sciences* 366: 742–756.
- Koch PC & Heß M (2011). Topographic mapping of retinal neurons in the European anchovy by nuclear staining and immunohistochemistry. *Journal of Neuroscience Research* 89: 1316–1330.

- Koch PC, Seebacher C & Heß M (2010). 3D-topography of cell nuclei in a vertebrate retina – A confocal and two-photon microscopic study. *Journal of Neuroscience Methods* 188: 127–140.
- Kondrashev SL, Gnyubkina VP, Zueva LV & Govardovskii VI (2011). Retinal specialization for polarization and colour vision in two species of anchovies (Engraulidae, Clupeiformes). *European Retina Meeting 2011 (Amsterdam)*, abstract book: S. 64.
- Lamb TD (2009). Evolution of vertebrate retinal photoreception. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 364: 2911–2924.
- Land MF (1991). Polarizing the world of fish. *Nature* 353: 118–119.
- Loukashkin AS & Grant N (1965). Behavior and natural reactions of the northern anchovy, *Engraulis mordax* Girard, under the influence of light of different wavelengths and intensities and total darkness. *Proceedings of the California Academy of Sciences* 31: 631–692.
- Lyll AH (1957). The growth of the trout retina. *Quarterly Journal of Microscopic Science* 98: 101–110.
- Lythgoe JN (1972). The adaptation of visual pigments to the photic environment. In: Darnall HJA (ed.): *Handbook of sensory physiology 7/1 Photochemistry of vision*. Springer Verlag, Berlin. S. 566–603.
- Lythgoe JN (1975). Problems of seeing colours underwater. In: Ali MA (ed.): *Vision in fishes – new approaches in research*. Plenum Press, New York. S. 619–634.
- Lythgoe JN (1979). *The ecology of vision*. Clarendon Press, Oxford. 270 S.
- MacNeil MA & Masland RH (1999). Extreme diversity among amacrine cells: Implications for function. *Neuron* 20: 971–982.
- McEwan MR (1938). A comparison of the retina of mormyrids with that of various other teleosts. *Acta Zoologica* 19: 427–465
- Munk O (1966). On the retina of *Diretmus argenteus* Johnson, 1863 (Diretmidae, Pisces). *Videnskabelige Meddelelser fra Dansk Naturhistorisk Forening i København* 129: 73–80.
- Munz FW (1958). The photosensitive retinal pigments of fishes from relatively turbid coastal waters. *Journal of General Physiology* 42: 445–459.
- Mussi M, Haimberger TJ & Hawryshyn CW (2005). Behavioural discrimination of polarized light in the damselfish *Chromis viridis* (family Pomacentridae). *Journal of Experimental Biology* 208: 3037–3046.
- Nicol JAC, Arnott HJ & Best ACG (1973). Tapeta lucida in bony fishes (Actinopterygii): A survey. *Canadian Journal of Zoology* 51: 69–81.
- Novales Flamarique I (2000). The ontogeny of ultraviolet sensitivity, cone disappearance and regeneration in the sockeye salmon *Oncorhynchus nerka*. *The Journal of Experimental Biology* 203: 1161–1172.
- Novales Flamarique I (2011). Unique photoreceptor arrangements in a fish with polarized light discrimination. *Journal of Comparative Neurology* 519: 714–737.
- Novales Flamarique I & Harosi FI (2002). Visual pigments and dichroism of anchovy cones: A model system for polarization detection. *Visual Neuroscience* 19: 467–473.
- Novales Flamarique I & Hawryshyn CW (1996). Retinal development and visual sensitivity of young pacific sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Journal of Experimental Biology* 199: 869–882.

- Novales Flamarique I & Hawryshyn CW (1997). Is the use of underwater polarized light by fish restricted to crepuscular time periods? *Vision Research* 37: 975–989.
- Novales Flamarique I & Hawryshyn CW (1998). Photoreceptor types and their relation to the spectral and polarization-sensitivities of clupeid fishes. *Journal of Comparative Physiology A* 182: 793–803.
- Novales Flamarique I, Hawryshyn CW & Harosi FI (1998). Double-cone internal reflection as a basis for polarization detection in fish. *Journal of the Optical Society of America A* 15: 349–358.
- O'Connell CP (1963). The structure of the eye of *Sardinops caerulea*, *Engraulis mordax*, and four other pelagic marine teleosts. *Journal of Morphology* 113: 287–329.
- Parkyn DC & Hawryshyn CW (1993). Polarized-light sensitivity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Characterization from multi-unit responses in the optic nerve. *Journal of Comparative Physiology A* 172: 493–500.
- Parkyn DC & Hawryshyn CW (2000). Spectral and ultraviolet-polarisation sensitivity in juvenile salmonids: A comparative analysis using electrophysiology. *Journal of Experimental Biology* 203: 1173–1191.
- Penfield W (1975). The mystery of the mind: A critical study of consciousness and the human brain. *Princeton University Press, New Jersey*. 152 S.
- Protasov VP, Altukhov YP & Kovaleva ND (1960). Morphological and functional features of the transition from day vision to twilight vision in some Black Sea fish. *Doklady Akademii Nauk SSSR* 134: 195–198 (englische Übersetzung in: *Doklady Biological Science* 134: 694–696).
- Roberts NW & Needham MG (2007). A mechanism of polarized light sensitivity in cone photoreceptors of the goldfish *Carassius auratus*. *Biophysical Journal* 93: 3241–3248.
- Shashar N & Cronin TW (1996). Polarization contrast vision in *Octopus*. *Journal of Experimental Biology* 199: 999–1004.
- Shashar N, Rutledge PR & Cronin TW (1996). Polarization vision in cuttlefish – a concealed communication channel? *Journal of Experimental Biology* 199: 2077–2084.
- Wainwright SA (1988). Axis and circumference: The cylindrical shape of plants and animals. *Harvard University Press, Cambridge*. 176 S.
- Walls GL (1942). The vertebrate eye and its adaptive radiation. *The Cranbrook Institute of Science, Bloomfield Hills, Michigan*. 785 S.
- Waterman TH (1954). Polarization patterns in submarine illumination. *Science* 120: 927–932.
- Waterman TH & Forward RB jr. (1970). Field evidence for polarized light sensitivity in the fish *Zenarchopterus*. *Nature* 228: 85–87.
- Wunder W (1930). Bau und Funktion der Netzhaut beim Zander (*Lucioperca sandra* Cuv. und Val.) und einigen anderen im Balatonsee häufige Fischarten. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* 11: 749–766.
- Zueva LV (1980). Retinal cones of the black sea anchovy *Engraulis encrasicolus* – an analyzer of polarized light in vertebrates. *Zhurnal Evolyutsionnoi Biokimii i Fiziologii* 17: 602–605 (englische Übersetzung in: *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 17: 420–425.).

Zueva LV & Govardovskii VI (1991). Photoreceptors and visual pigments in the retina of the Black Sea anchovy, *Engraulis encrasicolus*. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 27: 384–389.

Zyznar ES & Nicol JAC (1973). Reflecting materials in the eyes of three teleosts, *Orthopristes chrysopterus*, *Dorosoma cepedianum* and *Anchoa mitchilli*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 184: 15–27.

7 BEITRÄGE DER AUTOREN

Histologie der inneren Retina der Sardelle *Engraulis encrasicolus*.

Petra C. Koch: Präparation, Versuchsdurchführung, Manuskript

Martin Heß: Konzeption

3D-topography of cell nuclei in a vertebrate retina – A confocal and two-photon microscopic study. *Journal of Neuroscience Methods* 188: 127–140.

Petra C. Koch: Präparation, Färbung, Datenakquise am CLSM, Zellkernzählung und –kartierungen, Manuskript

Christian Seebacher: Datenakquise am 2-Photonen-Mikroskop

Martin Heß: Konzeption, Datenakquise am CLSM, Bestimmung der optimalen Messpunktdichte, Manuskript

Topographic mapping of retinal neurons in the European anchovy by nuclear staining and immunohistochemistry. *Journal of Neuroscience Research* 89: 1316–1330.

Petra C. Koch: Präparation und Versuchsdurchführung, Datenakquise, Manuskript

Martin Heß: Konzeption, Datenakquise, Manuskript

3D-Ultrastruktur des retinalen Nervennetzes bei *Engraulis encrasicolus*.

Petra C. Koch: Rekonstruktionsarbeit, Manuskript

Gerhard Wanner: Datenakquise am FIB-FESEM

Martin Heß: Präparation, Datenakquise am FIB-FESEM, Konzeption

Die Richtigkeit der Angaben wird bestätigt.

PD Dr. Martin Heß

Petra C. Koch

8 PUBLIKATIONSLISTE

Originalarbeiten

- [2] **Koch PC** & Heß M (2011). Topographic mapping of retinal neurons in the European anchovy by nuclear staining and immunohistochemistry. *Journal of Neuroscience Research* 89: 1316–1330.
- [1] **Koch PC**, Seebacher C & Heß M (2010). 3D-topography of cell nuclei in a vertebrate retina – A confocal and two-photon microscopic study. *Journal of Neuroscience Methods* 188: 127–140.

Kongressbeiträge

- [11] **Koch PC** & Heß M (München 2011). Durchblick im Dendritengewirr der Sardellenretina: FIB-FESEM basierte 3D-Rekonstruktion eines neuronalen Netzwerkes. *4. Graduiertenforum der Fachgruppe Morphologie der Deutschen Zoologischen Gesellschaft*, abstract booklet: 19.
- [10] **Koch PC** & Heß M (Amsterdam 2011). A closer look into the anchovy retina: FIB-FESEM based 3D-reconstruction of a neuronal network. *European Retina Meeting 2011*, abstract booklet: 60–61.
- [9] Heß M, **Koch PC** & Wanner G (Amsterdam 2011). Disentangling the neuronal network of the retina in 10 nm isotropic resolution. *European Retina Meeting 2011*, abstract booklet: 105–106.
- [8] Heß M, **Koch PC** & Wanner G (Göttingen 2011). Disentangling the retinal cable mess – FIB-SEM based 3D-reconstruction of the anchovy inner retina in high resolution. *9th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society*, proceedings T23–18A
- [7] **Koch PC**, Wanner G & Heß M (Wien 2010). Solving the Gordian Knot: The outer plexiform layer of the European anchovy *Engraulis encrasicolus* investigated by Focussed Ion Beam-SEM. *3. Graduiertenforum der Fachgruppe Morphologie der Deutschen Zoologischen Gesellschaft*, abstract booklet: 41.
- [6] Heß M & **Koch PC** (Wien 2010). Erfassung, Analyse und Visualisierung von 3D-Strukturdaten am Beispiel von Sehsystemen. *3. Graduiertenforum der Fachgruppe Morphologie der Deutschen Zoologischen Gesellschaft*, abstract booklet: 18–19.
- [5] **Koch PC** & Heß M (Bielefeld 2010). Visualizing „invisible“ tissue: topography of immunocytochemically labeled retinal neurons of the European anchovy *Engraulis encrasicolus*. *21. Neurobiologischer Doktoranden Workshop (Neuro DoWo)*, abstract booklet: 84–85.

- [4] **Koch PC**, Seebacher C & Heß M (Würzburg 2009). Valleys deep, mountains high – 3D-topography of cell nuclei in the anchovy retina. *20. Neurobiologischer Doktoranden Workshop (Neuro DoWo)*, abstract booklet: 112–113.
- [3] **Koch PC** & Heß M (München 2009). Insights into anchovy vision - retinal neuroanatomy of *Engraulis encrasicolus*. *Interact Munich 2009*, abstract booklet: 77.
- [2] **Koch P**, Migawski T, Gensler H & Heß M (Fort Lauderdale, Florida 2008). Pseudo-4D-visualization of the seahorse larva head during ontogenesis. *11th International Coral Reef Symposium*.
- [1] **Koch P** & Heß M (Münster 2006). Pseudo-4D-visualization of a flatfish head during metamorphosis. *99. Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft*, abstract booklet: 137.

9 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

Alle Abbildungen, die der Literatur entnommen wurden, sind mit Quellenangaben versehen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist und dass ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

München, den 18.10.2011

.....
Petra C. Koch